

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ
ESCUELA DE POSGRADO



**DESARROLLO DE UN SENSOR QUÍMICO A BASE DE NANOPARTÍCULAS
DE ORO PARA LA DETERMINACIÓN DE Hg^{2+} EN MUESTRAS DE AGUA
UTILIZANDO DISPERSIÓN RAYLEIGH DE RESONANCIA.**

Tesis para optar el grado de Magíster en Química que presenta el alumno

GLIBVER JOSE VASQUEZ VILLAFANA

Dirigido por

DR. YVES PAUL COELLO DE LA PUENTE

Miembros del Jurado

DRA. YULÁN HERNÁNDEZ GARCÍA

DR. YVES PAUL COELLO DE LA PUENTE

DR. JAVIER NAKAMATSU KUNIYOSHI

San Miguel, 2016

RESUMEN

La detección de diferentes iones de metales pesados en las diversas fuentes de agua que existen ha sido de gran interés para diversos investigadores y autoridades públicas por el riesgo que estos suponen para la salud de los seres vivos. Debido a la elevada toxicidad que la sola presencia de uno de ellos supone, se han establecido estándares nacionales e internacionales de la cantidad máxima que los recursos hídricos deberían contener en su composición. De toda la gama de metales pesados existentes, el Hg^{2+} es uno de los más contaminantes y, de acuerdo a la Agencia de Protección Ambiental de EE. UU. (EPA), la cantidad máxima permisible en el agua potable es 10 nM. Pese a que existen técnicas y protocolos establecidos para detectar la presencia de Hg^{2+} en agua, se ha visto la necesidad de encontrar métodos alternativos para su detección de una manera más rápida, barata y potencialmente portátil. Todo ello ha dado lugar al uso de sensores químicos de nanopartículas, los cuales han mostrado tener una muy buena aplicabilidad para tal fin [1,2].

En este trabajo se ha optimizado un sensor colorimétrico de Hg^{2+} basado en la agregación de nanopartículas de oro (AuNPs) inducida por lisina, previamente reportado en la literatura, y se le ha adaptado a un esquema de detección basado en dispersión Rayleigh de resonancia (DRR). En primer lugar, se llevó a cabo la síntesis de AuNPs de diferentes tamaños utilizando la metodología planteada por Turkevich y Frens de reducción de una sal de oro con citrato sódico, siguiendo el proceso de síntesis directa y otro de nucleación y crecimiento de nanopartículas. Se obtuvieron AuNPs de aproximadamente 14, 42 y 78 nm de diámetro con las cuales se procedió a realizar los estudios de detección de Hg^{2+} por espectrofotometría UV-Visible. Se llevó a cabo la optimización de varios parámetros experimentales incluyendo concentración de AuNPs, concentración del agente reductor de Hg^{2+} (citrato de sodio), concentración de lisina y tiempo de contacto entre reactivos.

Una vez establecidas las condiciones óptimas aparentes en el ensayo de absorción para cada tamaño de AuNPs, se procedió a realizar las curvas de calibración tanto por absorción como por DRR. Se encontró que para la mayoría de casos era posible detectar concentraciones de hasta 10 nM de Hg^{2+} en agua a nivel de estándares de laboratorio. Mediante una comparación de los resultados obtenidos, se determinó que la mejor respuesta la brindaba el sensor de dispersión con AuNPs de 42 nm, siendo 10 nM de Hg^{2+} la concentración más baja que se ha conseguido detectar con una muy buena relación señal/ruido. Posteriormente, se realizó un estudio de interferencias utilizando diversos aniones y cationes que pudiesen encontrarse en una matriz de agua potable real, obteniéndose que estos iones no tenían una influencia apreciable en la variación de la señal del sensor. Finalmente, se evaluó con éxito la aplicabilidad del sensor en una muestra real de agua potable contaminada con Hg^{2+} .

AGRADECIMIENTO ESPECIAL A INNÓVATE-PERÚ

Esta investigación fue parcialmente financiada por Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad, Innóvate-Perú, a través del contrato N° 119-PNICP-PIAP-2015, del cual esta tesis forma parte.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mi familia. A mis padres, por brindarme la oportunidad de poder empezar una carrera universitaria y por la paciencia que me han tenido todos estos años que hemos pasado juntos. A mi hermano Jefferson, con quien siempre he encontrado algún momento en el que sonreír y pasar grandes momentos de diversión. A ellos les dedico este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC), que en convenio con la Pontificia Universidad Católica del Perú (PUCP) me brindó la beca integral para cursar mis estudios de maestría. A Innóvate-Perú, la Dirección de Gestión de la Investigación de la PUCP y al programa de la Maestría en Química por financiar este trabajo de investigación.

A mi asesor, el Dr. Yves Coello, por su apoyo constante y las sugerencias que me ha brindado a lo largo de toda la tesis y por la calidez y amabilidad con la que me ha respondido a las interrogantes que he tenido en todo momento.

A la Dra. Yulán Hernández, por su gran apoyo en la síntesis de nanopartículas de oro y por su paciencia y orientación a lo largo del trabajo experimental realizado; sin su apoyo, este trabajo hubiese demorado mucho más tiempo en concluirse.

A la Dra. Patricia Morales, quien me orientó en cómo elaborar un trabajo de investigación así como por su preocupación en el avance de los becarios a lo largo de los estudios de posgrado.

A la Lic. Milka Cajahuanca por el apoyo brindado en la realización de los estudios por espectrofotometría UV-Visible y de dispersión.

A los profesores de la Maestría en Química de la Pontificia Universidad Católica del Perú, por sus enseñanzas y sugerencias.

A mis compañeros becarios, con quienes pasamos buenos momentos juntos y en especial a Betty Teves y Pierr Ruiz, quienes estuvieron en todo momento brindándome su apoyo y muchos ánimos a lo largo de toda la tesis.

Índice general

Índice general.....	i
Índice de figuras.....	iv
Índice de tablas.....	viii
Abreviaturas.....	x
1 Introducción.....	1
2 Objetivos.....	3
2.1 Objetivo general.....	3
2.2 Objetivos específicos.....	3
3 Marco teórico.....	3
3.1 Nanopartículas de oro.....	3
3.1.1 Propiedades de las nanopartículas de oro.....	4
3.1.1.1 Resonancia del plasmón superficial localizado.....	5
3.1.2 Síntesis de nanopartículas de oro.....	7
3.1.2.1 Reducción de oro.....	8
3.1.2.2 Nucleación y crecimiento de nanopartículas.....	10
3.1.2.3 Estabilización de nanopartículas.....	11
3.1.3 Caracterización de nanopartículas de oro.....	11
3.1.3.1 Caracterización por espectrofotometría UV-Visible.....	11
3.2 Sensores químicos de nanopartículas metálicas.....	12
3.2.1 Sensores ópticos.....	13
3.2.1.1 Sensores colorimétricos.....	14
3.2.1.1.1 Sensores colorimétricos para la detección de Hg.....	14
3.2.1.2 Sensores de dispersión.....	15
4 Hipótesis.....	17

5	Parte experimental.....	18
5.1	Reactivos utilizados, materiales y equipos.....	18
5.1.1	Reactivos y materiales.....	18
5.1.2	Equipos.....	19
5.2	Metodologías.....	19
5.2.1	Síntesis de nanopartículas.....	19
5.2.2	Caracterización de AuNPs mediante espectrofotometría UV-Visible.....	21
5.2.3	Detección de Hg ²⁺ con AuNPs.....	21
5.2.3.1	Protocolo inicial.....	22
5.2.3.2	Protocolo propuesto: Cambio en el orden de adición de los reactivos.....	22
5.2.3.3	Protocolo propuesto optimizado: Uso de citrato de sodio.....	23
5.2.4	Estudio de interferentes.....	23
5.3	Resultados experimentales.....	24
5.3.1	Caracterización de nanopartículas por espectrofotometría UV-Visible.....	24
5.3.2	Estudio de detección de Hg ²⁺ con AuNPs de 14 nm de diámetro.....	26
5.3.2.1	Pruebas preliminares de interacción entre los reactivos utilizados.....	26
5.3.2.2	Efecto de la concentración de AuNPs en detección de Hg ²⁺	27
5.3.2.3	Efecto de la concentración de lisina en la detección de Hg ²⁺	30
5.3.2.4	Efecto del tiempo de contacto entre AuNPs y Hg ²⁺ previo a la adición de lisina..	31
5.3.2.5	Efecto de la concentración de citrato de sodio.....	33
5.3.2.6	Curva de calibración de Hg ²⁺ mediante medidas de absorción.....	36
5.3.2.7	Curva de calibración de Hg ²⁺ mediante medidas de dispersión de luz.....	38
5.3.3	Estudio de detección de Hg ²⁺ con AuNPs de 42 nm de diámetro.....	40
5.3.3.1	Pruebas preliminares de interacción entre los reactivos utilizados.....	41
5.3.3.2	Efecto de la concentración de citrato de sodio.....	42
5.3.3.3	Curva de calibración de Hg ²⁺ mediante medidas de absorción.....	45
5.3.3.4	Curva de calibración de Hg ²⁺ mediante medidas de dispersión de luz.....	47
5.3.4	Estudio de detección de Hg ²⁺ con AuNPs de 78 nm de diámetro.....	49
5.3.4.1	Curva de calibración de Hg ²⁺ mediante medidas de absorción.....	50
5.3.4.2	Curva de calibración de Hg ²⁺ mediante medidas de dispersión de luz.....	53
5.3.5	Estudio de detección de Hg ²⁺ en presencia de interferentes.....	55

6	Discusiones de resultados	57
6.1	Síntesis de AuNPs de diferente tamaño	57
6.2	Estudios de detección de Hg ²⁺ con AuNPs de diferente tamaño	59
6.2.1	Efecto de la concentración de AuNPs	59
6.2.2	Efecto del tiempo AuNPs – Hg	60
6.2.3	Efecto de la concentración de lisina.....	62
6.2.4	Efecto de la adición de citrato de sodio	63
6.2.5	Efecto del tamaño de partícula	65
6.2.6	Curvas de calibración de Hg ²⁺	66
6.2.7	Estudio de interferencias	68
7	Conclusiones y recomendaciones	68
7.1	Conclusiones.....	68
7.2	Recomendaciones	69
8	Referencias bibliográficas	69

Índice de figuras

Figura 1. Vitral de una catedral coloreado con AuNPs. Tomado de la referencia [45].....	4
Figura 2. Esquema que ilustra la LSPR.	6
Figura 3. Representación esquemática de los procesos de síntesis de nanopartículas por “bottom up” y “top down”.	7
Figura 4. Reducción de oro con citrato de sodio.	9
Figura 5. Espectros UV-Vis e imágenes por microscopía electrónica de transmisión de AuNPs esféricas de diferente tamaño.	12
Figura 6. Elementos de un sensor químico de AuNPs y una representación del proceso de detección.....	13
Figura 7. Propiedades fisicoquímicas de las AuNPs que pueden aprovecharse en el diseño de sensores químicos.	13
Figura 8. Representación esquemática del sensor colorimétrico de Hg^{2+} reportado por Sener y col.	15
Figura 9. Representación esquemática de los diferentes tipos de dispersión de la luz incidente sobre una nanopartícula metálica.	16
Figura 10. Síntesis de nanopartículas de diferentes tamaños mediante el proceso de nucleación y crecimiento.	20
Figura 11. Representación esquemática de los tres protocolos empleados para la cuantificación de Hg^{2+}	23
Figura 12. Representación esquemática del protocolo planteado para el estudio de interferentes en ausencia y presencia de Hg^{2+}	24
Figura 13. Espectro visible de las AuNPs obtenidas mediante el proceso de síntesis directa.....	24
Figura 14. Espectros visibles de las AuNPs sintetizadas mediante el proceso de nucleación y crecimiento.	25

Figura 15. Espectros visibles de los experimentos de interacción entre los reactivos.....	27
Figura 16. Relación de absorbancias $A_{640\text{nm}}/A_{520\text{nm}}$ en función del tiempo para los experimentos de detección de diferentes concentraciones de Hg^{2+} utilizando AuNPs de 14 nm a una concentración de 1.38 nM.	28
Figura 17. Relación de absorbancias $A_{640\text{nm}}/A_{520\text{nm}}$ en función del tiempo para la detección de diferentes concentraciones de Hg^{2+} utilizando AuNPs de 14 nm a una concentración de 0.43 nM. 29	
Figura 18. Relación de absorbancias $A_{640\text{nm}}/A_{520\text{nm}}$ en función del tiempo para la determinación de la concentración óptima aparente de lisina que permitirá detectar Hg^{2+} en agua.....	30
Figura 19. Relación de absorbancias $A_{640\text{nm}}/A_{520\text{nm}}$ en función del tiempo para evaluar la influencia del tiempo de contacto entre las AuNPs y el Hg^{2+}	31
Figura 20. Relación de absorbancias $A_{640\text{nm}}/A_{520\text{nm}}$ en función del tiempo para ensayos realizados siguiendo el protocolo inicial y el protocolo propuesto.	32
Figura 21. Relación de absorbancias $A_{640\text{nm}}/A_{520\text{nm}}$ en función del tiempo para la detección de concentraciones de Hg^{2+} menores que 1.5 μM aplicando el protocolo propuesto.....	33
Figura 22. Relación de absorbancias $A_{640\text{nm}}/A_{520\text{nm}}$ en función del tiempo de los experimentos para evaluar la detección de Hg^{2+} 0.5 μM con AuNPs de 14 nm utilizando citrato de sodio.	34
Figura 23. Relación de absorbancias $A_{640\text{nm}}/A_{520\text{nm}}$ en función del tiempo para la detección de diferentes concentraciones de Hg^{2+} utilizando citrato de sodio 5 mM.	35
Figura 24. Relación de absorbancias $A_{640\text{nm}}/A_{520\text{nm}}$ en función del tiempo para la detección de Hg^{2+} 100 nM utilizando diferentes concentraciones de citrato de sodio.	36
Figura 25. Espectros visibles para diferentes concentraciones de Hg^{2+} utilizando AuNPs de 14 nm y el protocolo propuesto optimizado.	37
Figura 26. Relación de absorbancias $A_{640\text{nm}}/A_{520\text{nm}}$ en función del tiempo para diferentes concentraciones de Hg^{2+} utilizando AuNPs de 14 nm y el protocolo propuesto optimizado.	37
Figura 27. Curva de calibración de Hg^{2+} por espectrofotometría UV-Visible a los 15 minutos de reacción utilizando AuNPs de 14 nm y el protocolo propuesto optimizado.	38
Figura 28. Espectros de dispersión para diferentes concentraciones de Hg^{2+} utilizando AuNPs de 14 nm y el protocolo propuesto optimizado.	39

Figura 29. Relación de intensidades $I_{685\text{nm}}/I_{560\text{nm}}$ en función del tiempo de los experimentos para diferentes concentraciones de Hg^{2+} utilizando AuNPs de 14 nm y el protocolo propuesto optimizado.	39
Figura 30. Curva de calibración de Hg^{2+} por DRR a los 10 minutos de reacción utilizando AuNPs de 14 nm y el protocolo propuesto optimizado. El inset muestra la respuesta lineal del ensayo a bajas concentraciones de Hg^{2+} ..	40
Figura 31. Espectros visibles para el estudio de interacción entre los reactivos utilizados.	41
Figura 32. Espectros visibles de las AuNPs de 42 nm con diferentes concentraciones de citrato de sodio en ausencia de Hg^{2+} ..	42
Figura 33. Relación de absorbancias $A_{750\text{nm}}/A_{530\text{nm}}$ en función del tiempo para la detección de Hg^{2+} con AuNPs de 42 nm y citrato de sodio 5 mM.	43
Figura 34. Relación de absorbancias $A_{750\text{nm}}/A_{530\text{nm}}$ en función del tiempo para la detección de Hg^{2+} 100 nM utilizando AuNPs de 42 nm y diferentes concentraciones de citrato de sodio.	44
Figura 35. Espectros visibles para diferentes concentraciones de Hg^{2+} utilizando AuNPs de 42 nm y el protocolo propuesto optimizado.	45
Figura 36. Relación de absorbancias $A_{750\text{nm}}/A_{530\text{nm}}$ en función del tiempo para diferentes concentraciones de Hg^{2+} utilizando AuNPs de 42 nm y el protocolo propuesto optimizado.	46
Figura 37. Curva de calibración de Hg^{2+} por espectrofotometría UV-Visible a los 5 minutos de reacción utilizando AuNPs de 42 nm y el protocolo propuesto optimizado.	46
Figura 38. Espectros de dispersión para diferentes concentraciones de Hg^{2+} utilizando AuNPs de 42 nm y el protocolo propuesto optimizado.	47
Figura 39. Relación de intensidades $I_{690\text{nm}}/I_{555\text{nm}}$ en función del tiempo de los experimentos para diferentes concentraciones de Hg^{2+} utilizando AuNPs de 42 nm y el protocolo propuesto optimizado.	48
Figura 40. Curva de calibración de Hg^{2+} por DRR a los 5 minutos de reacción utilizando AuNPs de 42 nm y el protocolo propuesto optimizado.	48
Figura 41. Espectros visibles de las AuNPs de 78 nm al interactuar con diferentes concentraciones de citrato de sodio.	50

Figura 42. Espectros visibles para diferentes concentraciones de Hg^{2+} utilizando AuNPs de 78 nm y el protocolo propuesto optimizado.	51
Figura 43. Relación de absorbancias A_{730nm}/A_{545nm} en función del tiempo para diferentes concentraciones de Hg^{2+} utilizando AuNPs de 78 nm y el protocolo propuesto optimizado.	52
Figura 44. Curva de calibración de Hg^{2+} por espectrofotometría UV-Visible a los 5 minutos de reacción utilizando AuNPs de 78 nm y el protocolo propuesto optimizado.	52
Figura 45. Espectros de dispersión para diferentes concentraciones de Hg^{2+} utilizando AuNPs de 78 nm y el protocolo propuesto optimizado.	53
Figura 46. Relación de intensidades I_{695nm}/I_{605nm} en función del tiempo de los experimentos para diferentes concentraciones de Hg^{2+} utilizando AuNPs de 78 nm y el protocolo propuesto optimizado.	54
Figura 47. Curva de calibración de Hg^{2+} por DRR a los 5 minutos de reacción utilizando AuNPs de 78 nm y el protocolo propuesto optimizado	54
Figura 48. Efecto de los posibles interferentes en el método de detección en ausencia y en presencia de Hg^{2+} ..	55
Figura 49. Comparación de detección de Hg^{2+} en agua Milli-Q y en agua de caño de la Pontificia Universidad Católica del Perú.	56
Figura 50. Proceso de crecimiento de nanopartículas.....	58
Figura 51. Representación de la repartición de una misma cantidad Hg^{2+} en las AuNPs al reducirse en su superficie cuando se utilizan a) altas concentraciones de AuNPs y b) bajas concentraciones de AuNPs.	60
Figura 52. Interacción de las AuNPs con el mercurio reducido sobre su superficie.....	61
Figura 53. Efecto de la cantidad de lisina utilizada en la detección de Hg^{2+} en donde se muestra una misma cantidad de AuNPs recubiertas con Hg^{2+} adicionándole a) una alta concentración de lisina y b) una baja concentración de lisina.	62
Figura 54. Reducción de Hg^{2+} en la superficie de las AuNPs por acción del citrato de sodio cuando a) hay una cantidad adecuada de citrato de sodio en el medio para reducir el Hg^{2+} y cuando b) hay deficiencia de citrato de sodio en el medio y no se reduce todo el Hg^{2+}	65

Índice de tablas

Tabla 1. Lista de los reactivos utilizados en el proceso de síntesis de AuNPs y detección de Hg^{2+} ..	18
Tabla 2. Longitud de onda de la banda LSPR y tamaño estimado de las AuNPs más pequeñas. λ_{max} se refiere a la longitud de onda del máximo de la banda LSPR.	25
Tabla 3. Longitud de onda de la banda LSPR y tamaño estimado de las AuNPs sintetizadas por el proceso de nucleación y crecimiento.....	25
Tabla 4. Coeficientes de absortividad molar de las AuNPs seleccionadas.	26
Tabla 5. Pruebas preliminares de interacción entre los reactivos utilizados.	26
Tabla 6. Experimentos iniciales para detectar Hg^{2+} con AuNPs de 14 nm.....	28
Tabla 7. Experimentos para detectar Hg^{2+} utilizando AuNPs de 14 nm 0.43 nM.	29
Tabla 8. Experimentos para evaluar el efecto de la concentración de lisina en la detección de Hg^{2+}	30
Tabla 9. Experimentos para evaluar el efecto del tiempo de contacto AuNPs - Hg^{2+} en la detección de Hg^{2+}	31
Tabla 10. Experimentos de comparación entre los protocolos aplicados para la detección de Hg^{2+}	32
Tabla 11. Experimentos para detectar concentraciones menores que 1.5 μM de Hg^{2+} aplicando el protocolo propuesto.	33
Tabla 12. Experimentos comparativos para ver la influencia del citrato de sodio en la detección de Hg^{2+} 0.5 μM	34
Tabla 13. Detección de concentraciones de Hg^{2+} menores a 500 nM utilizando citrato de sodio 5 mM.	35
Tabla 14. Experimentos para evaluar la concentración de citrato de sodio óptima para la detección de concentraciones bajas de Hg^{2+} utilizando AuNPs de 14 nm.	35
Tabla 15. Experimentos para obtener la curva de calibración de Hg^{2+} por absorción utilizando las AuNPs de 14 nm y citrato de sodio 20 mM.....	36
Tabla 16. Experimentos para obtener las curvas de calibración de Hg^{2+} por DRR utilizando AuNPs de 14 nm y una concentración de citrato de sodio 20 mM.	38
Tabla 17. Pruebas preliminares de interacción entre los reactivos utilizados.	41

Tabla 18. Experimentos para evaluar la estabilidad de las AuNPs de 42 nm en presencia de diferentes concentraciones de citrato de sodio.	42
Tabla 19. Experimentos para detectar concentraciones de Hg ²⁺ menores a 500 nM utilizando AuNPs de 42 nm y una concentración de citrato de sodio 5 mM.....	43
Tabla 20. Experimentos de detección de Hg ²⁺ 100 nM utilizando diferentes concentraciones de citrato de sodio.	44
Tabla 21. Experimentos para obtener la curva de calibración de Hg ²⁺ por espectrofotometría UV-Visible utilizando AuNPs de 42 nm y una concentración de citrato de sodio 10 mM.	45
Tabla 22. Experimentos para obtener las curvas de calibración de Hg ²⁺ por DRR utilizando AuNPs de 42 nm y una concentración de citrato de sodio 10 mM.	47
Tabla 23. Evaluación de la concentración óptima de citrato de sodio a usar en la detección de Hg ²⁺ utilizando AuNPs de 78 nm.	49
Tabla 24. Experimentos para obtener la curva de calibración de Hg ²⁺ por absorción utilizando las AuNPs de 78 nm y una concentración de citrato de sodio 5 mM.....	51
Tabla 25. Experimentos para obtener las curvas de calibración de Hg ²⁺ por dispersión utilizando las AuNPs de 78 nm y una concentración de citrato de sodio 5 mM.....	53
Tabla 26. Sales utilizadas en el estudio de influencia de interferentes en la detección de Hg ²⁺	55
Tabla 27. Comparación de los resultados obtenidos aplicando las dos técnicas de detección de Hg ²⁺ y utilizando los tres tamaños de AuNPs.	67

Abreviaturas

A	absorbancia
AuNPs	nanopartículas de oro
Cit	citrato de sodio
col.	colaboradores
DR	dispersión Rayleigh
DRR	dispersión Rayleigh de resonancia
I	intensidad
Lis	lisina
λ	longitud de onda
LSPR	plasmón superficial de resonancia localizado
SPR	plasmón superficial de resonancia
UV-Vis	ultravioleta-visible

1 Introducción

Por varios años la contaminación ambiental por iones de metales pesados ha sido de gran interés en todo el mundo [3,4]. Iones de metales pesados como Ni^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cr^{6+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Cr^{3+} , Mn^{2+} y Hg^{2+} , son considerados contaminantes ambientales y la mayoría de ellos son tóxicos para los seres humanos incluso a bajas concentraciones [5,6]. El agua es uno de los recursos naturales más importantes que se ve afectado por los iones de metales pesados entre los que se puede resaltar el mercurio, cadmio y plomo dado que estos pueden causar serios problemas ambientales y de salud debido a sus altas toxicidades para con los organismos biológicos [7,8].

En particular, el Hg^{2+} es considerado como uno de los iones metálicos más tóxicos y altamente nocivos [2,8,9], ya que al entrar en contacto con algún organismo es capaz de causarle severos daños. Tal es la toxicidad de este ion, que cuando se acumula en organismos vivos llega a dañar el ADN, inhibir las interacciones biomoleculares, generar un mal funcionamiento del hígado y los riñones, además de enlazarse a la hemoglobina del organismo disminuyendo de esta manera la cantidad de oxígeno que llega a los tejidos, lo que causa la muerte inminente del organismo [4,7–11].

Adicionalmente, se debe resaltar que en las últimas décadas es de gran preocupación la gran cantidad de mercurio que se encuentra en la naturaleza, el cual proviene de actividades tales como la minería, quema de restos fósiles, actividades industriales, etc. Cada una de las fuentes mencionadas por sí sola no contribuye en gran medida a la contaminación por mercurio en la tierra, pero el efecto en conjunto es perjudicial para el medio ambiente [9,10,12].

Es así que, debido a la elevada toxicidad del Hg^{2+} y a su presencia en las fuentes de agua por la contaminación ambiental, resulta importante poder llevar a cabo un monitoreo de los niveles de este ion metálico en el agua (ya sea para consumo, en mares, lagos, etc.) con la finalidad de utilizar tal información para desarrollar medidas de contención y mitigación de este contaminante [4–10,13].

Hoy en día existe una diversidad de métodos analíticos que involucran el uso de instrumentos sofisticados para detectar el ion Hg^{2+} en los recursos hídricos. Entre estos métodos analíticos se encuentran la espectroscopía de absorción atómica, espectroscopía de fluorescencia, espectroscopía de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente y espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente [4,7,10,14].

Dichas técnicas analíticas, pese a que son efectivas para determinar el ion Hg^{2+} en medio acuoso, tienen limitaciones que dificultan la aplicación del proceso analítico. Entre estas limitaciones se puede mencionar que se requiere una instrumentación muy costosa, el tiempo de análisis es largo y se necesita un tratamiento previo de la muestra que resulta ser laborioso y que no puede ser aplicado en todos los casos [4,5,10]. Por las razones anteriormente mencionadas, resulta de gran interés el poder desarrollar métodos de detección de Hg^{2+} que sean, además de sensibles y selectivos, de bajo costo, rápidos y potencialmente portátiles.

En este contexto, la aplicación de sensores químicos a base de nanopartículas aparece como una gran promesa debido a la simplicidad con las que se les puede utilizar para detectar diversos analitos, su bajo costo y los rápidos tiempos de análisis que se pueden lograr [1,4,5,7,15–22].

De entre la gama de sensores químicos que existen, los sensores colorimétricos vienen siendo empleados crecientemente debido a que pueden ser fácilmente monitoreados a simple vista o utilizando un espectrofotómetro UV-visible sin necesidad de instrumentos más complicados [5,7,17,23–25]. En particular, los sensores colorimétricos basados en nanopartículas de metales nobles (oro y plata) son de gran interés debido a las buenas propiedades ópticas de éstas, las cuales dependen del tamaño y la agregación de las partículas, entre otros parámetros [1,4,5,15,23,26,27].

Las AuNPs pueden ser también buenas dispersoras de luz, por lo que han sido utilizadas para el desarrollo de sensores de dispersión. Se ha reportado que la luz dispersada por una nanopartícula de oro puede ser igual a la dispersada por 10^5 moléculas fluorescentes [28]. Recientemente, las propiedades de dispersión de las AuNPs se han aprovechado en la detección de iones metálicos y moléculas orgánicas con límites de detección menores a los que se obtienen por medidas de absorción de luz [3,15,28–35].

Por todo lo expuesto anteriormente, en este trabajo se ha desarrollado un método de detección de Hg^{2+} rápido, sensible y selectivo basado en medidas de DRR aplicable al análisis de aguas contaminadas.

2 Objetivos

2.1 Objetivo general

- Desarrollar un sensor químico de dispersión utilizando AuNPs recubiertas con citrato para determinar Hg^{2+} en muestras de agua de manera rápida, sensible y selectiva.

2.2 Objetivos específicos

- Sintetizar AuNPs estabilizadas con citrato de aproximadamente 15, 40 y 80 nanómetros empleando el método directo y el de nucleación y crecimiento, y caracterizarlas mediante espectroscopía UV-visible.
- Optimizar el ensayo colorimétrico inducido por lisina para la detección de Hg^{2+} en muestras acuosas (estándares de laboratorio y muestras reales) empleando las AuNPs previamente preparadas.
- Adaptar el ensayo colorimétrico de detección de Hg^{2+} a un esquema de detección basado en DRR.

3 Marco teórico

3.1 Nanopartículas de oro

Se define como nanopartícula a aquella partícula que posee una o más dimensiones del orden de 100 nm o menos. Entre las características que poseen las nanopartículas se tiene que (i) poseen una composición bien definida que incluye un amplio rango de compuestos inorgánicos tales como metales, óxidos, sulfuros, etc., (ii) poseen una gran relación superficie/volumen y (iii) presentan propiedades catalíticas y electrónicas reproducibles las cuales son dependientes del tamaño, la forma y la naturaleza de las partículas [36].

Debido a su tamaño nanométrico, las nanopartículas exhiben propiedades físicas y químicas únicas, muy diferentes de las que presentan sus homólogos a escala macroscópica. Dichas propiedades únicas se explican como una consecuencia de los efectos cuánticos de tamaño, los cuales son resultado de su estructura electrónica específica [37].

Las AuNPs han sido ampliamente estudiadas debido a las numerosas aplicaciones que estas tienen en biotecnología, nanomedicina, microelectrónica, catálisis, y en la óptica, siendo en este último campo en donde las AuNPs han llamado la atención debido a las propiedades únicas que poseen y que las hacen excelentes candidatas para la fabricación de novedosos sensores químicos y biológicos [1,3,5,15,23,26,29,37–43].

3.1.1 Propiedades de las nanopartículas de oro

De entre las propiedades que poseen las nanopartículas de metales nobles, el efecto que se produce en sus espectros ópticos de absorción ha llamado la atención de diversos científicos desde la edad media debido a los colores llamativos que presentan sus soluciones coloidales. Se tiene información que debido a los colores llamativos de las AuNPs, estas fueron utilizadas en el siglo XVII para dar un pigmento de color rubí a vitrales de iglesias y catedrales como la famosa Catedral de Notre Dame (Figura 1) [11,44].



Figura 1. Vitral de una catedral coloreado con AuNPs. Tomado de la referencia [45].

Entre las características de las AuNPs obtenidas a través de diversos métodos, se ha resaltado que son estables, poseen propiedades ópticas únicas, muestran una excelente compatibilidad para asociarse con ligandos apropiados (tioles, aminas, piridinas, imidazoles, etc.) y, finalmente, las propiedades de las AuNPs pueden ser modificadas variando su forma, tamaño y el ambiente químico. Las características mencionadas hacen a las AuNPs de gran interés para el desarrollo de novedosas rutas para el diseño de sensores con mejoras en la sensibilidad, estabilidad y selectividad [1,29,46].

Debido a la reducción de la dimensión de los materiales a una escala nanométrica se producen cambios drásticos en sus propiedades electrónicas puesto que dicha reducción afecta la densidad de los estados electrónicos así como la escala espacial donde se llevan a cabo los movimientos de los electrones. Cabe resaltar que a una escala nanométrica los efectos superficiales tienden a ser más importantes debido a que hay un aumento considerable en el área superficial de las nanopartículas [44].

Adicionalmente, se debe resaltar que el uso de nanopartículas de oro como detectores de biomoléculas específicas y de metales tóxicos pesados ha aparecido como una herramienta colorimétrica importante debido a que las AuNPs brindan una plataforma adecuada para la multifuncionalización con un amplio rango de ligandos orgánicos y biológicos que permiten un enlace selectivo con diversos analitos, lográndose la detección de estos en diversas matrices [1,23].

3.1.1.1 Resonancia del plasmón superficial localizado.

Los fenómenos ópticos que se producen cuando la luz interactúa con las AuNPs fueron reconocidos por primera vez por Faraday en 1857 [42,44]. La explicación teórica del porqué de tales fenómenos, fue dada por Mie en 1908 utilizando para ello las ecuaciones de Maxwell para partículas pequeñas esféricas y homogéneas que interactúan con un campo electromagnético. Dichos fenómenos ópticos están relacionados con la resonancia del plasmón superficial localizado (LSPR) de las nanopartículas. La LSPR tiene su origen en la oscilación conjunta de los electrones (oscilación coherente) de la banda de conducción, inducida por un campo electromagnético en resonancia con las oscilaciones (Figura 2). El campo electromagnético causa dicha excitación resonante debido a los fotones entrantes puesto que el diámetro de las nanopartículas es mucho menor que la de la longitud de onda de la luz visible [1].

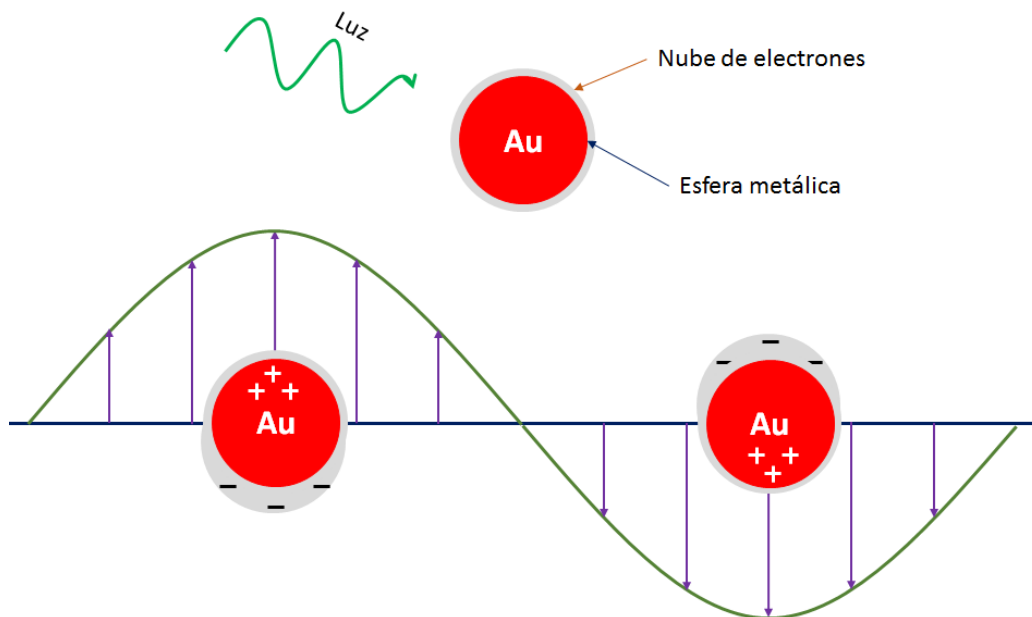


Figura 2. Esquema que ilustra la LSPR. Adaptada de Link y col. [44].

La longitud de onda del máximo de absorción de la LSPR y el ancho de dicha banda dependen del tamaño y la forma de las nanopartículas metálicas, así como de las constantes dieléctricas del propio metal y del medio que rodea a la partícula (agua, solventes orgánicos, sustancias adsorbidas, etc.) [44].

Los colores intensos de las AuNPs esféricas tienen su origen en la LSPR pues la banda correspondiente cae en la región visible del espectro electromagnético y posee elevados coeficientes de extinción, varios órdenes de magnitud mayores que los de fluoróforos orgánicos comunes [42,44].

Una propiedad importante en el contexto de los sensores químicos de AuNPs, es el desplazamiento de la banda correspondiente a la LSPR, que puede ser causado por alteraciones en las características originales de las AuNPs tales como cambios en su tamaño, forma o entorno químico, incluyendo especies químicas adsorbidas y distancia entre nanopartículas [32,33]. En particular el desplazamiento de la banda LSPR por agregación de AuNPs se debe a que esta agregación induce un acoplamiento plasmónico, esto es, un acoplamiento entre los plasmones superficiales entre partículas cercanas que da como resultado un típico cambio de color [1].

3.1.2 Síntesis de nanopartículas de oro

Debido a la gran cantidad de aplicaciones de las AuNPs, se requieren de protocolos de síntesis mediante los cuales se lleguen a obtener AuNPs con formas y tamaños definidos. Esto ha traído como consecuencia que hoy en día exista una gran variedad de rutas de síntesis las cuales brindan productos finales con diferentes características [40].

En general, las AuNPs pueden ser sintetizadas tanto por los procedimientos “top down” y “bottom up” (Figura 3). El proceso “top down” consiste en obtener nanopartículas partiendo del material en estado macroscópico, lo cual se logra mediante una ruptura sistemática hasta obtener las nanopartículas con las dimensiones deseadas. Sin embargo, los métodos “top down” no permiten obtener todas las formas y tamaños deseados ya que el producto obtenido está determinado por el equipo utilizado. Entre los métodos de síntesis de nanopartículas por medio de procesos “top down” se tienen técnicas tales como la litografía, la molienda o el desgaste de materiales [37,47,48].

Por otro lado, los procesos “bottom up” tienen como objetivo generar las nanopartículas deseadas a través de la unión de átomos individuales. Estos procesos permiten controlar mejor la forma y el tamaño de las nanopartículas que se desean obtener, convirtiéndolo en la mejor manera de obtener productos monodispersos para su uso en investigación. Existe gran diversidad de técnicas “bottom up”, entre las cuales se pueden mencionar la condensación por vapor químico, proceso sol-gel, microemulsión, proceso sonoquímico y reducción química [49,50].

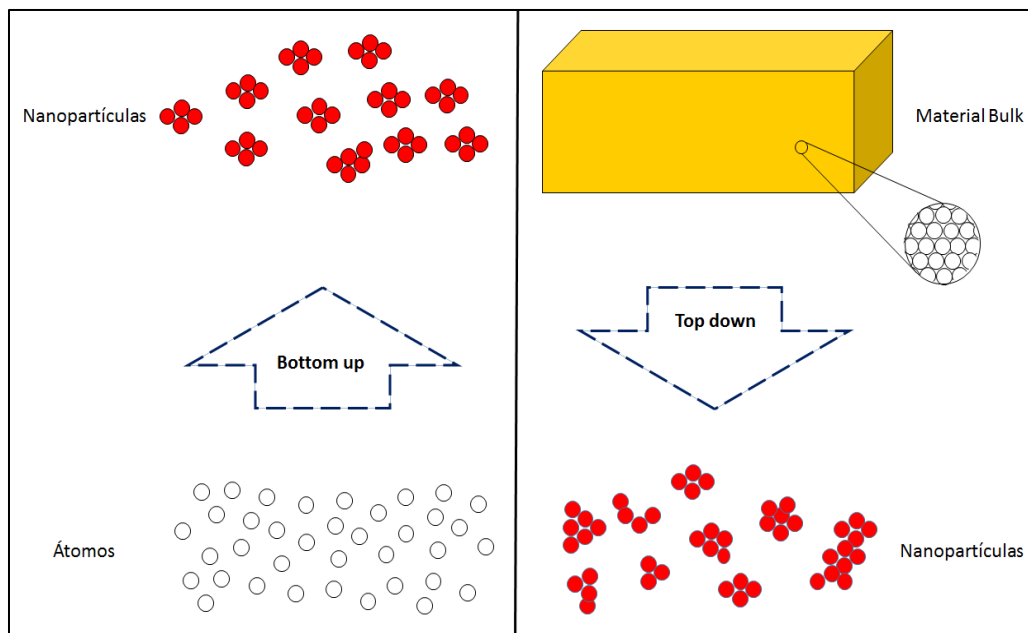


Figura 3. Representación esquemática de los procesos de síntesis de nanopartículas por “bottom up” y “top down”. Adaptada de Zhao y col. [37].

3.1.2.1 Reducción de oro

Se han dirigido esfuerzos continuos durante las últimas décadas para controlar tanto la forma como el tamaño de las nanopartículas de oro [41]. Entre los métodos de obtención de dichas nanopartículas, una gran variedad de síntesis se basan en el proceso de reducción de sales de oro [1,40].

El primer trabajo sobre síntesis de AuNPs mediante procesos “bottom up” fue el realizado por Turkevich en el año de 1951, el cual estaba basado en un proceso de reducción química. Turkevich reportó las bases experimentales para la obtención de AuNPs mediante reducción de una sal de oro con citrato sódico, y estudió el efecto que tienen la temperatura y la concentración de los reactivos en el tamaño y la distribución de tamaños de las partículas. El procedimiento propuesto por Turkevich es muy confiable y permite obtener AuNPs esféricas de 16 a 20 nm de diámetro estabilizadas por iones citrato [1,38,41,43,51–53]. Frens, en el año 1973, publicó un artículo en el cual reportaba que, basándose en el método propuesto por Turkevich, se podían obtener diferentes tamaños de AuNPs cambiando la concentración de citrato de sodio que se usa en la reacción, obteniéndose nanopartículas esféricas de diferentes tamaños en un rango de 16 – 150 nm de diámetro [43,52,54]. Según Kimling y col., concentraciones elevadas de citrato estabilizan las AuNPs produciendo tamaños más pequeños, mientras que bajas concentraciones de citrato producen AuNPs de tamaños más grandes e, incluso, la formación de agregados [37].

En general, la síntesis por reducción considera como factores críticos dos elementos: la fuerza del reductor utilizado y el agente estabilizador [40]. Para la preparación de AuNPs por medio de reducción química, los agentes reductores más utilizados por diversos investigadores son borohidruros, formaldehído, alcoholes insaturados, citrato de sodio, ácido oxálico, azúcares, peróxido de hidrógeno y acetileno, entre otros. En lo que se refiere a agentes estabilizadores, se ha reportado el uso de citrato de sodio, ligandos tiolados, ligandos a base de nitrógeno, surfactantes, etc. [37,52].

De entre todos los métodos existentes, uno de los más extendidos es el que involucra la reducción de oro con citrato (método de Turkevich-Frens) debido a las diversas ventajas que este presenta, tales como el bajo costo del agente reductor, el uso de agua como solvente, y que esta reacción no genera subproductos que puedan afectar al medio ambiente [29,40,43]. Esta síntesis involucra ácido tetracloroaurico (HAuCl_4) y citrato de sodio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$), y este último actúa como agente reductor y como agente estabilizador [37,38,41,52,53,55].

El mecanismo de reacción por el cual procede la síntesis de AuNPs utilizando el método de Turkevich-Frens, ha sido objeto de varias investigaciones en los últimos años [38]. Kumar y col. establecieron que se trata de un mecanismo basado en etapas múltiples. En una etapa inicial se encuentra que la oxidación del citrato produce una dicarboxi acetona a través de una serie de reacciones que ocurren tanto en serie como en paralelo. Simultáneamente a la oxidación del anión citrato, se produce la reducción de los iones Au^{3+} a $\text{Au}(0)$ y, posteriormente, estos átomos se reúnen entre sí para dar origen a las AuNPs además de formarse CO_2 como subproducto de la reacción (Figura 4) [37].

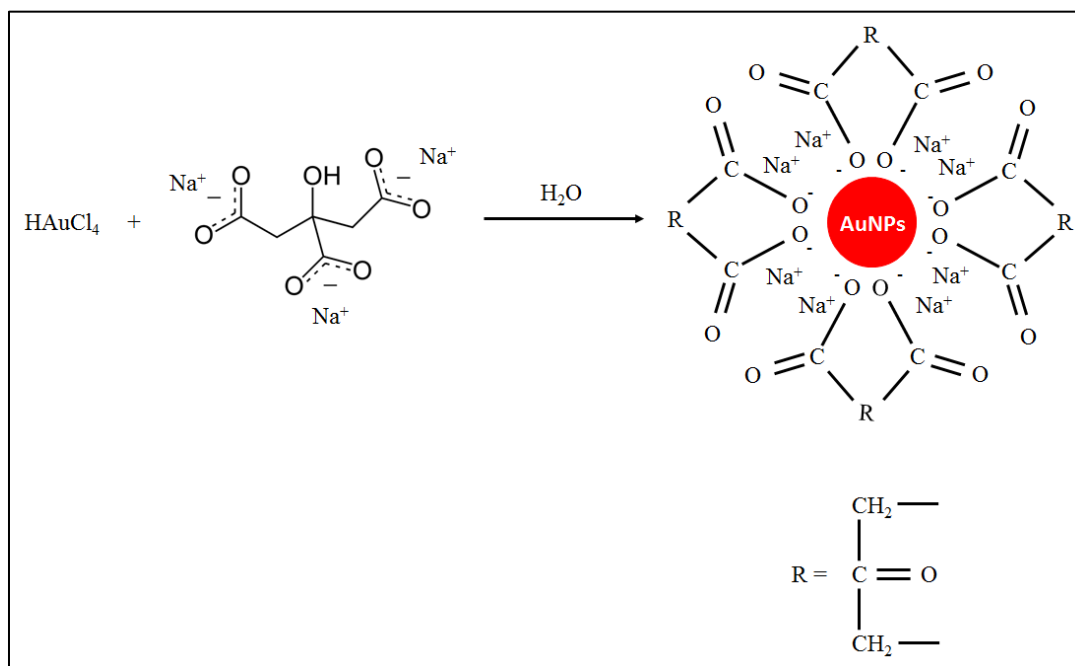


Figura 4. Reducción de oro con citrato de sodio. Adaptada de Zhao y col. [37].

Se debe tener en cuenta que el citrato de sodio aparte del rol de reductor que tiene en la síntesis, también cumple la función de modular el pH del sistema, que tiene influencia en el tamaño y la distribución de las nanopartículas. En base a resultados experimentales, se puede mencionar que cuando el tamaño de las AuNPs es pequeño se llega a obtener nanopartículas más monodispersas. Lo contrario sucede cuando el tamaño de partícula aumenta (especialmente por encima de los 20 nm), pues en tales casos es más probable que la polidispersidad del producto sea elevada [37].

3.1.2.2 Nucleación y crecimiento de nanopartículas

En la síntesis de nanopartículas, se define como precursor químico al reactante que contiene al catión metálico presente en el producto final [56]. Cuando se produce la síntesis de nanopartículas, los precursores pasan por una primera etapa en la solución en la que reaccionan según las condiciones brindadas dando lugar a la reducción del catión metálico y a la formación de complejos con los ligandos presentes en la solución. Conforme las condiciones del sistema cambian, se producirá en la solución la formación de núcleos que se generan por un aumento en la concentración del soluto favoreciendo de esta manera que aparezca una fase sólida en el sistema. El proceso de formación de núcleos en la solución se denomina nucleación. Sobre estos núcleos comenzarán a incorporarse nuevos átomos que se generen, proceso conocido como crecimiento [41,56].

Si no se controlan bien las condiciones de reacción, la nucleación y crecimiento pueden ocurrir simultáneamente y esto traerá como consecuencia una población polidispersa de partículas. La polidispersidad de las partículas obtenidas está definida por una competencia entre la velocidad de crecimiento y la de nucleación, descrita por el modelo de La Mer [56]. Esta relación de velocidades se puede controlar en base a las condiciones experimentales. Si la velocidad de crecimiento supera por mucho a la velocidad de nucleación, se obtienen nanopartículas de mayor tamaño; mientras que si la velocidad de nucleación supera la de crecimiento, se produce la formación de nuevos núcleos y se obtienen nanopartículas más pequeñas [56].

Cuando las etapas de nucleación y crecimiento se completan en un único paso, se trata de una síntesis *in situ* y está dirigida a la obtención de nanopartículas de un tamaño específico. Por otro lado, si se llevan a cabo una o más etapas de crecimiento, el proceso recibe el nombre de nucleación-crecimiento y tiene como objetivo obtener nanopartículas más grandes [37].

3.1.2.3 Estabilización de nanopartículas

Para comprender la estabilidad de las nanopartículas es necesario entender las fuerzas de interacción principales que hacen posible dicha estabilidad. La teoría DLVO, desarrollada por Derjaguin, Landau, Verwey y Overbeek, hace posible que se pueda conocer la energía total de interacción entre dos partículas bajo la consideración de que sólo las interacciones de Van der Waals y las interacciones electrostáticas son importantes [56]. Las interacciones de Van der Waals tienen su origen en la naturaleza dipolar de las moléculas y esta fuerza de interacción es generalmente atractiva. La interacción electrostática entre dos partículas se debe a las cargas eléctricas adsorbidas sobre la superficie de estas, las cuales pueden ser atenuadas en un grado variable por la doble capa eléctrica que estas poseen. Cuando dos partículas están alejadas, las capas de contraiones que se encuentran alrededor de cada partícula no se solapan y no hay efecto en ellas de interacción electrostática. Por otro lado, si se llegan a acercar lo suficiente, sus capas de contraiones empiezan a solaparse causando la aparición de una energía de interacción positiva por el efecto de una mayor concentración de contraiones sobre cada partícula. El poder controlar la estabilidad de las nanopartículas en base a la modificación de estas variables es la raíz del éxito de la teoría de DLVO [56].

3.1.3 Caracterización de nanopartículas de oro

3.1.3.1 Caracterización por espectrofotometría UV-Visible

Las propiedades ópticas que poseen las AuNPs están relacionadas con el proceso de síntesis mediante el cual se han obtenido porque este último determina su distribución de tamaños. Los colores que exhiben las AuNPs esféricas se pueden relacionar de una manera rápida y simple con el tamaño de éstas. Se observa que a mayor longitud de onda de la banda LSPR, el tamaño de las AuNPs obtenidas será mayor (Figura 5) [1].

Haiss y col. realizaron un análisis teórico para estudiar la dependencia de las propiedades ópticas de las AuNPs esféricas (longitud de onda del máximo de absorción y el coeficiente de extinción molar) con su tamaño. Estos resultados muestran que existe una relación cuantificable entre la longitud de onda de la banda LSPR y el diámetro de las AuNPs esféricas. El resultado brindado por el estudio de Haiss ha permitido determinar de manera aproximada el tamaño de las AuNPs obtenidas en este trabajo mediante espectrofotometría UV-Visible. Adicionalmente, el estudio de Haiss ha permitido determinar la concentración de AuNPs obtenidas en base a una tabla que relaciona el diámetro de partícula con su coeficiente de absorción molar [57].

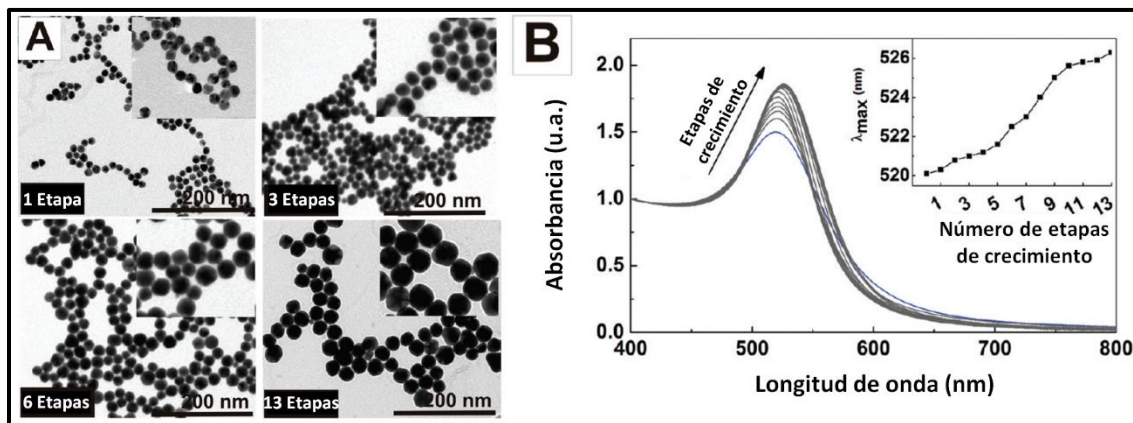


Figura 5. Espectros UV-Vis e imágenes por microscopía electrónica de transmisión de AuNPs esféricas de diferente tamaño. La figura muestra un proceso de crecimiento de AuNPs por etapas. La ubicación de la banda LSPR (λ_{max}) en el espectro UV-Visible aumenta con el tamaño de partícula. Adaptada de Bastús y col. [41].

3.2 Sensores químicos de nanopartículas metálicas

Un sensor se define como un dispositivo capaz de detectar y responder a un estímulo físico tal como temperatura, presión, etc., y transformar la correspondiente señal adecuadamente. Los sensores químicos en general se caracterizan por constar de dos componentes fundamentales (Figura 6). Un sensor debe contener un elemento reconocedor, que debe ser capaz de enlazarse a determinados analitos de tal manera que dicho enlace se produzca preferentemente de manera específica y selectiva. Otro de los requisitos fundamentales en un sensor químico es que sea capaz de hacer evidente mediante alguna señal el enlace con los analitos que se están detectando (elemento transductor) [1].

La eficiencia de un sensor químico, la cual está determinada por los dos componentes funcionales de todo sensor, está relacionada con el tiempo de respuesta de detección, la relación señal/ruido (S/N), la selectividad hacia los analitos a detectar, y los límites de detección que se pueden obtener [1].

Por lo mencionado anteriormente, el diseño de sensores depende en gran medida del desarrollo de materiales novedosos para mejorar tanto el proceso de reconocimiento del analito como el proceso de transducción. El desarrollo de sensores altamente sensibles y de bajo costo requiere de tecnología avanzada junto con un conocimiento fundamental en química, biología y ciencia de materiales. Es en este contexto que debido a las propiedades fisicoquímicas únicas de las nanopartículas metálicas, se ha considerado que éstas puedan ser de gran utilidad en la creación de nuevos procesos de reconocimiento y transducción para sensores químicos y biológicos [1].

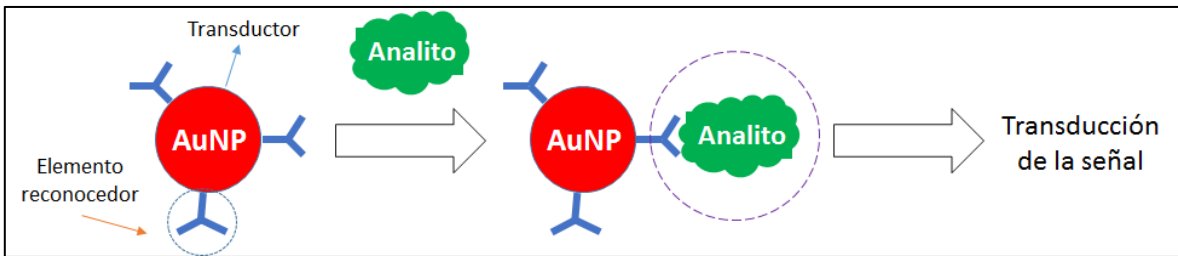


Figura 6. Elementos de un sensor químico de AuNPs y una representación del proceso de detección. Adaptado de Saha y col. [1].

Cuando ocurre el enlace entre el elemento reconocedor y un analito, puede inducirse una alteración en las propiedades fisicoquímicas de las AuNPs tales como la LSPR, la conductividad, el comportamiento redox, etc. Esta alteración genera una señal o respuesta detectable (Figura 7) [1].

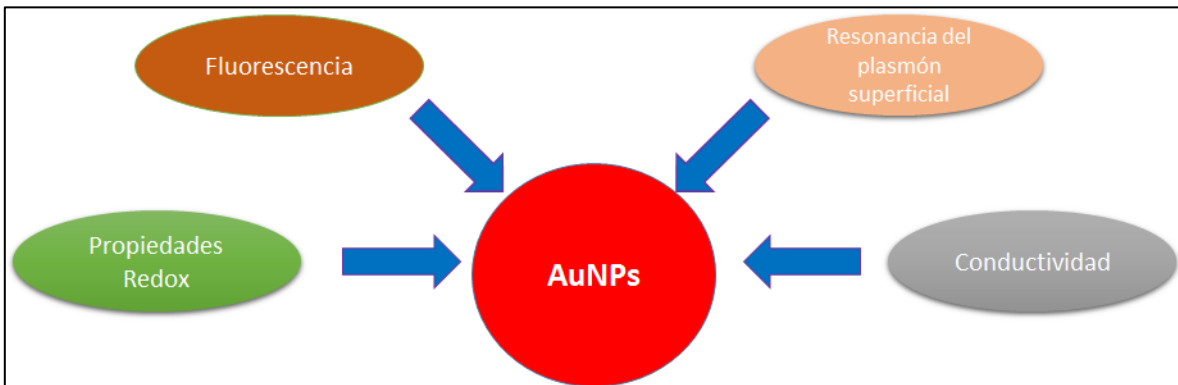


Figura 7. Propiedades fisicoquímicas de las AuNPs que pueden aprovecharse en el diseño de sensores químicos. Adaptada de Saha y col. [1].

Por lo mencionado antes, en las últimas décadas las AuNPs se han empleado ampliamente para el diseño de sensores ópticos aplicados a una variedad de sustancias [1,3,15,28–34].

3.2.1 Sensores ópticos

El hecho de que la LSPR de las nanopartículas sea sensible al entorno local de éstas (moléculas adsorbidas en su superficie, separación entre partículas, etc.) ha generado que se preste mucha atención al uso de AuNPs en el diseño de sensores ópticos [1,4,5,7,11,23,29,32,40,44,58]. A continuación, se mencionan los principios de los sensores ópticos de interés para este trabajo: los sensores de absorción o colorimétricos y los sensores de dispersión Rayleigh, así como algunos ejemplos de los muchos usos que se les han dado para la detección de analitos.

3.2.1.1 Sensores colorimétricos

Se han desarrollado una gran variedad de sensores colorimétricos para detectar diversos tipos de analitos tales como moléculas orgánicas, iones de metales alcalinos y alcalinos térreos, iones de metales pesados, aniones y proteínas, entre otros [1,5,23,59]. La gran mayoría de ellos se basan en la agregación o redispersión de AuNPs y su influencia en los cambios en el plasmón de resonancia superficial. Dichos cambios inducen variaciones en el color de las muestras durante la agregación de las AuNPs (o la redispersión de un agregado de éstas), lo cual brinda una plataforma práctica para la detección visual o espectrofotométrica de cualquier analito que genere una agregación o redispersión de las AuNPs [1].

La detección colorimétrica de cualquier analito con AuNPs puede realizarse ya sea por interacción directa con éste o mediante la incorporación de agentes reconocedores sobre la superficie de las nanopartículas. El proceso de detección se da cuando se llega a producir la agregación de las nanopartículas, inducida por la presencia del analito, formándose complejos multidentados entre partículas con los ligandos estabilizadores [1].

3.2.1.1.1 Sensores colorimétricos para la detección de Hg

Como se mencionó anteriormente, la detección de Hg^{2+} en medio acuoso es de gran interés debido a la toxicidad de este ion para los seres vivos. A continuación se mencionan algunos sensores colorimétricos reportados en la literatura para la detección de Hg^{2+} en agua.

Yang-Rae y col. reportaron una metodología para detectar Hg^{2+} en medio acuoso en base a la interacción del analito con tioles. Utilizando AuNPs recubiertas con citrato, se realizó la funcionalización de la superficie con ditioeritritol ($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2$). De esta manera, utilizando las AuNPs funcionalizadas con ditioeritritol (DTET-AuNPs) se logró detectar Hg^{2+} en muestras acuosas a través de la interacción sulfuro – Hg^{2+} – sulfuro [2].

Dingbin y col. reportaron un método para detectar Hg^{2+} en medio acuoso utilizando AuNPs recubiertas con grupos tiol que contienen un grupo amonio cuaternario terminal. Las AuNPs utilizadas para la detección se estabilizaron utilizando el (11-mercapto-undecil)-trimetil amonio (MTA) como molécula con un grupo amonio cuaternario (QA) que termina en un grupo tiol. Las AuNPs se recubren con MTA a través de un enlace Au – S para formar las QA-AuNPs. La adición de Hg^{2+} a las QA-AuNPs ocasiona que ocurra una reacción de desplazamiento de los iones Hg^{2+} con los tioles quimisorbidos en la superficie de las AuNPs, facilitando la abstracción de ligandos de la superficie de las AuNPs. La falta de cargas suficientes o agentes estabilizadores en la superficie de las AuNPs, induce la agregación de las AuNPs. Este ensayo fue capaz de detectar hasta 30 nM de Hg^{2+} [11].

Sener y col. realizaron un ensayo para determinar Hg^{2+} en muestras acuosas utilizando lisina ($\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$) y AuNPs de 24 nm recubiertas con citrato. El procedimiento consiste en adicionar Hg^{2+} a las AuNPs de tal manera que los iones se depositen en la superficie de las AuNPs. A continuación, se adiciona lisina, la cual induce la agregación por entrecruzamiento al enlazarse a las AuNPs recubiertas con Hg^{2+} dando lugar a un rápido cambio de color de rojo a púrpura o gris debido al acortamiento de la distancia entre AuNPs. El ensayo permitió detectar hasta 2.9 nM de concentración de Hg^{2+} [7].

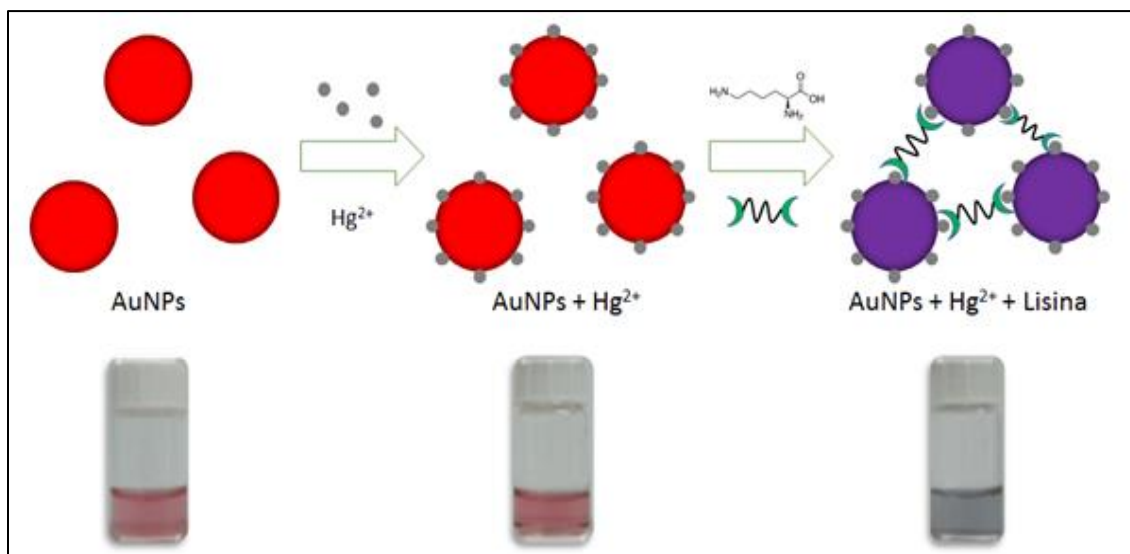


Figura 8. Representación esquemática del sensor colorimétrico de Hg^{2+} reportado por Sener y col. De izquierda a derecha se muestra la secuencia de etapas involucradas en el proceso de detección de Hg^{2+} . Adaptada de Sener y col. [7].

3.2.1.2 Sensores de dispersión

Rayleigh, en 1899, explicó por primera vez el proceso de dispersión que hoy lleva su nombre [26]. Cuando una muestra es irradiada por un haz de luz, la trayectoria de dicho haz puede continuar en base a los distintos fenómenos que puede experimentar: transmisión, absorción o dispersión. La mayoría de los haces de luz que son dispersados poseen la misma longitud de onda que el haz incidente; a dicha dispersión se le conoce como dispersión Rayleigh (DR) o dispersión elástica. La luz dispersada cuya frecuencia se ve desplazada debido a los movimientos de vibración y de rotación de las moléculas, se denomina dispersión Raman o inelástica, la cual posee una intensidad mucho menor que la DR (Figura 9) [26].

La dispersión Rayleigh de resonancia (DRR) es una dispersión elástica particular que se produce cuando la longitud de onda de excitación coincide o es cercana a una banda de absorción molecular o a la banda LSPR, en el caso de nanopartículas [3,60]. La técnica de DRR ha sido utilizada para cuantificar moléculas de manera muy sensible debido a que el límite de detección es varios órdenes de magnitud más bajo que el de otras técnicas espectroscópicas. En los últimos años, esta técnica ha sido aplicada para el estudio y determinación de compuestos orgánicos, macromoléculas biológicas, iones inorgánicos y surfactantes catiónicos debido a su simplicidad, rapidez y sensibilidad empleando para ello fluorímetros [6,11,28,31,34,60–62].

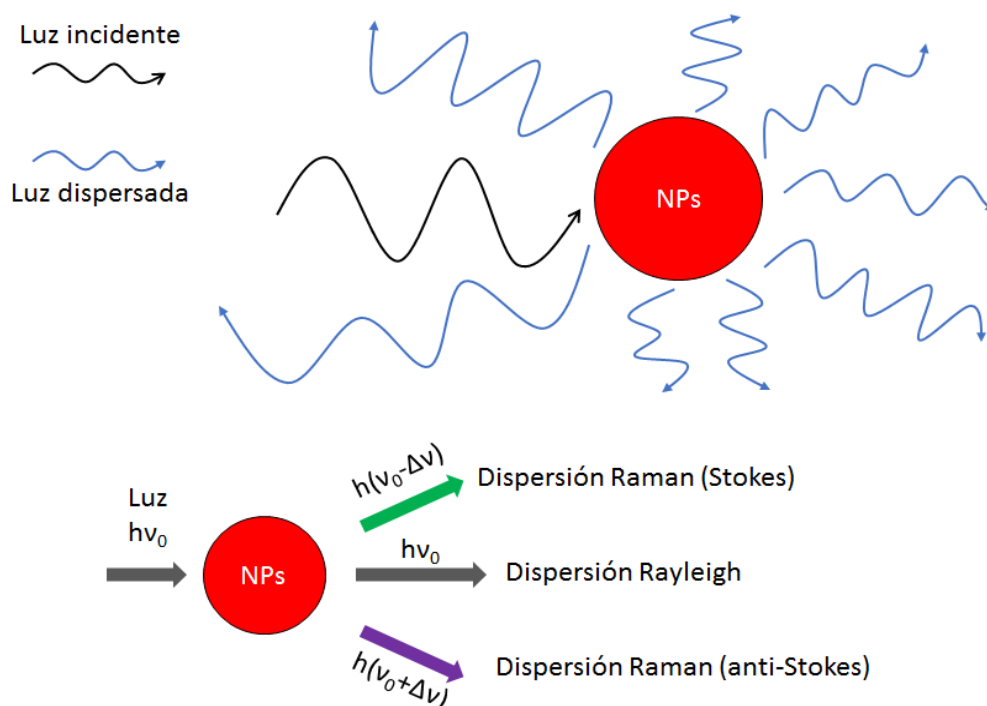


Figura 9. Representación esquemática de los diferentes tipos de dispersión de la luz incidente sobre una nanopartícula metálica. Adaptada de Liang y col. [61].

Aunque compuestos orgánicos se han utilizado comúnmente en los ensayos con DRR, también se han empleado diferentes nanomateriales tales como las AuNPs, nanopartículas de plata y los *quantum dots* [6]. En el caso particular de las nanopartículas, es importante resaltar que la magnitud de la DRR es varios órdenes de magnitud mayor que la fluorescencia emitida por especies moleculares. Teniendo en cuenta lo mencionado antes, es lógico plantear como hipótesis que la DRR que involucra el uso de nanopartículas pueda ser una técnica muy sensible para la detección y cuantificación de analitos que se encuentren a concentraciones muy bajas (trazas) [3,39,63].

En un sensor DRR basado en la agregación de AuNPs como el propuesto en este trabajo, se emplea fotones de luz visible como fuente de excitación y se colecta la luz dispersada a 90°. El estado de agregación de las AuNPs se caracteriza mediante el espectro DRR, de modo análogo al espectro UV-visible de un sensor colorimétrico. A continuación, se mencionan algunos usos de la DRR en la detección de diferentes analitos empleando nanopartículas.

Yuangen y col. reportaron la detección de As^{3+} en solución acuosa mediante DRR utilizando una variedad de nanopartículas de diferentes tamaños acopladas con moléculas de un colorante de trifenilmetano denominado cristal violeta y el aptámero Ars-3. El límite de detección de este método fue de 0.2 ppb de As^{3+} [31].

Guo y col. informaron del uso de AuNPs para la determinación de la 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG) en la orina humana. La 8-OHdG, al ser combinada con las AuNPs en medio acuoso, produce un incremento en la intensidad de la DRR obteniéndose además una correlación lineal entre la intensidad de la DRR y la concentración de 8-OHdG adicionada sobre un rango de $1.0 \times 10^{-11} - 2.0 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ [39].

4 Hipótesis

Un sensor de AuNPs permite, en presencia de lisina cuantificar Hg^{2+} en muestras acuosas de manera selectiva, sensible y rápida mediante medidas de dispersión de luz (DRR).

5 Parte experimental

5.1 Reactivos utilizados, materiales y equipos

5.1.1 Reactivos y materiales

Los reactivos utilizados tanto en la síntesis de AuNPs como en la detección de Hg^{2+} se listan en la Tabla 1.

Tabla 1. Lista de los reactivos utilizados en el proceso de síntesis de AuNPs y detección de Hg^{2+} .

Nombre	Fórmula	Marca	Grado de pureza
Citrato de sodio dihidratado	$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	JT Baker	P.A.
Ácido tetracloroáurico trihidratado	$\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	Sigma-Aldrich	$\geq 99.9\%$
L-Lisina	$\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$	Sigma-Aldrich	$\geq 98\%$
Solución de nitrato de mercurio (II)	$\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$	Sigma-Aldrich	P.A.
Yoduro de sodio	NaI	Riedel-deHaen	P.A.
Nitrito de sodio	NaNO_2	Scharlau	98 %
Cloruro de magnesio hexahidratado	$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Riedel-deHaen	P.A.
Nitrato de sodio	NaNO_3	Merck	P.A.
Sulfato de sodio	Na_2SO_4	JT Baker	P.A.
Cloruro de hierro (III) hexahidratado	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Riedel-deHaen	P.A.
Cloruro de estroncio hexahidratado	$\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Merck	P.A.
Sulfato de hierro (II) heptahidratado	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Scharlau	P.A.
Fluoruro de sodio	NaF	Merck	P.A.
Bicarbonato de sodio	NaHCO_3	Scharlau	P.A.
Carbonato de sodio	Na_2CO_3	JT Baker	P.A.
Cloruro de potasio	KCl	Scharlau	P.A.
Tiosulfato de sodio pentahidratado	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Sigma-Aldrich	P.A.
Fosfato de disodio	Na_2HPO_4	JT Baker	P.A.
Cloruro de calcio dihidratado	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Merck	P.A.

El agua utilizada en todos los experimentos fue de grado Milli-Q obtenida de un sistema conformado por ósmosis inversa y filtración mediante filtro de fibra hueca con tamaño de poro 0.2 μm .

5.1.2 Equipos

Los equipos utilizados en la caracterización de las AuNPs y los estudios de detección de Hg^{2+} se encuentran en el laboratorio de Análisis Instrumental de la Sección de Química de la Pontificia Universidad Católica del Perú y son los siguientes:

- **Espectrofotómetro UV-Visible Perkin Elmer Lambda 850**, el cual cuenta con dos fuentes de radiación, una lámpara de deuterio y una lámpara de tungsteno-halógena, que cubren el rango de longitudes de onda 175-900 nm.
- **Espectrofluorímetro Perkin Elmer LS 55** que cuenta con una lámpara de xenón que permite cubrir un rango de 200 a 800 nm para medidas de excitación y de 200 a 900 nm en medidas de emisión.

5.2 Metodologías

5.2.1 Síntesis de nanopartículas

La síntesis de AuNPs más pequeñas se realizó con una metodología basada en el método de Turkevich-Frens [51,54,64]. El proceso consiste en disolver 10 mg de HAuCl_4 en 23 mL de agua Milli-Q en un balón acoplado a un refrigerante y llevarlo a ebullición. Una vez que la solución se encuentra en ebullición constante, se adiciona 1 mL de una solución acuosa de citrato de sodio (Na_3Ct) de 102 mM. La mezcla se deja reaccionar por un tiempo de 30 minutos en agitación constante hasta observar la formación de un producto final rojo intenso.

Para la preparación de AuNPs de aproximadamente 40 y 80 nm de diámetro, se usó una técnica de nucleación y crecimiento [41]. Esta técnica consiste en sintetizar AuNPs pequeñas, las cuales son utilizadas como semillas para que, por adición de diferentes cantidades de oro, su tamaño aumente hasta obtener el tamaño deseado. La Figura 10 muestra el esquema del proceso de nucleación y crecimiento, en donde $g_1 + 2\text{Au}$, $g_2 + 2\text{Au}$, $g_3 + 2\text{Au}$ y $g_4 + 2\text{Au}$ son denominadas generaciones y hacen referencias a diferentes tamaños de AuNPs que son obtenidos al terminar cada ciclo del proceso de síntesis.

La metodología de la síntesis de AuNPs por nucleación y crecimiento consiste en colocar 50 mL de citrato de sodio 2.2 mM en un balón de reacción de 150 mL con refrigerante y llevarlo a ebullición (aprox. 100°C). Una vez que la solución se mantiene en ebullición constante, se adiciona 0.333 mL de solución de HAuCl₄ 25 mM y se deja reaccionar durante 30 minutos. Las nanopartículas obtenidas en esta primera etapa son denominadas como la generación cero, cuya abreviatura es **g₀**.

Una vez terminada esta etapa, se procede a bajar la temperatura del sistema desde ebullición hasta 90 °C. Cuando la temperatura está a 90 °C, en el mismo balón se procede a adicionar 0.333 mL de solución de HAuCl₄ 25 mM para que prosiga la reacción por un tiempo de 30 minutos. Es importante mantener la temperatura constante a 90 °C durante todo el proceso. El producto obtenido en este proceso es denominado **g₀ + 1Au**. El procedimiento se repite una vez más con otra adición de 0.333 mL de HAuCl₄ 25 mM, dando un tiempo de 30 minutos a la reacción. Al producto obtenido se le denomina **g₀ + 2Au**, por las dos adiciones de oro que se sumaron. Luego de llegar a la etapa de dos adiciones de oro, se procede a extraer una porción de las AuNPs obtenidas dejando aproximadamente 18.3 mL del producto en el balón de reacción. El producto extraído (**g₀ + 2Au**) se almacena en refrigeración a 4 °C recubriendo el frasco con papel de aluminio para evitar alteraciones en este por efecto de la luz.

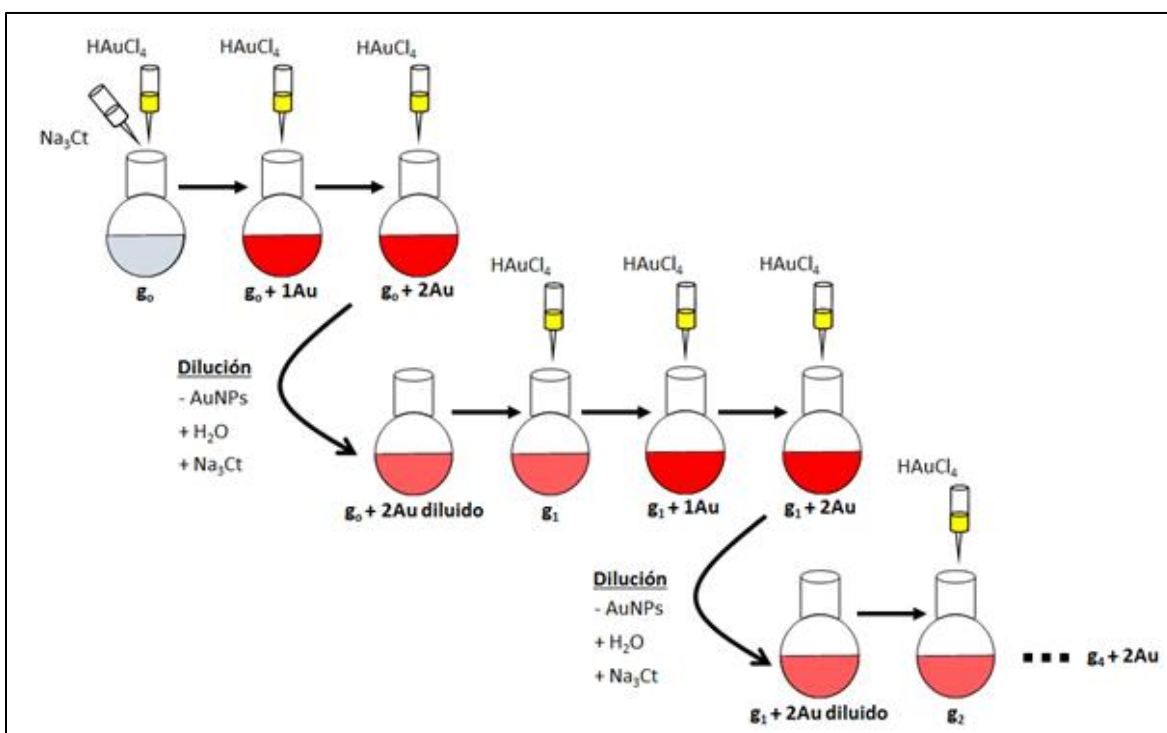


Figura 10. Síntesis de nanopartículas de diferentes tamaños mediante el proceso de nucleación y crecimiento. Adaptada de Bastús y col. [41].

Una vez extraído el producto, se adiciona aproximadamente 17.6 mL de agua Milli-Q y 0.666 mL de solución de citrato de sodio 60 mM al balón de reacción y la mezcla se mantiene en agitación durante 15 minutos para su completa homogeneización. A esta etapa de dilución del producto por adición de agua y citrato se le denomina **g₀ + 2Au diluido**. Los procesos de adición de HAuCl₄ 25 mM se repiten para obtener los productos **g₁, g₁ + Au y g₁ + 2Au**. El proceso se repite cíclicamente hasta la generación **g₄ + 2Au** en la cual se detiene por haber obtenido ya AuNPs del tamaño deseado (Figura 10).

5.2.2 Caracterización de AuNPs mediante espectrofotometría UV-Visible

La determinación del tamaño aproximado y la concentración de las AuNPs sintetizadas se ha realizado en base a la longitud de onda correspondiente al máximo de absorción de la banda LSPR (λ_{LSPR}) en el espectro UV-Visible tal como se ha reportado en la literatura [57]. Dicha longitud de onda permite determinar el diámetro promedio y el coeficiente de absortividad molar de las AuNPs en base a una tabla en la que el autor resume la relación directa entre el diámetro de la partícula con el valor del λ_{LSPR} para AuNPs con diámetros entre 32 y 108 nm. Para la determinación del tamaño de las AuNPs más pequeñas se tomó como base los resultados de caracterización que se realizaron a estas partículas en el estudio reportado por Conde y col. [64].

El proceso experimental para la determinación del máximo de absorción de la banda LSPR consistió en diluir las AuNPs obtenidas en una proporción 1:10 con agua Milli-Q y a medir el espectro UV-visible en el rango de 450 - 800 nm.

5.2.3 Detección de Hg²⁺ con AuNPs

Para llevar a cabo la detección de Hg²⁺ con AuNPs se hizo uso de tres protocolos de los cuales en uno de ellos se utiliza la metodología propuesta en la literatura [7] mientras que los otros dos se han propuesto en este trabajo en base a experimentos realizados a lo largo del estudio de detección de Hg²⁺. Los tres protocolos empleados se resumen en la Figura 11.

5.2.3.1 Protocolo inicial

Este protocolo está basado en el ensayo reportado por Sener y col. [7]. En este ensayo, el espectro UV-Visible de las AuNPs cambia en presencia de Hg^{2+} y lisina debido a la aglomeración de las AuNPs, lo cual permite la cuantificación de Hg^{2+} . La metodología consiste en colocar en un vial 1.3 mL de AuNPs a una determinada concentración apropiada para obtener una concentración final 0.43 o 1.38 nM para AuNPs de 14 nm, 12.9 pM para AuNPs de 42 nm y 1.88 pM para AuNPs de 78 nm. Posteriormente, se adiciona 0.1 mL de $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ a una concentración apropiada para obtener concentraciones finales en el rango 10 μM – 10 nM, manteniendo en contacto el Hg^{2+} y las AuNPs por 0 - 30 min a ~ 21 °C. Finalmente, se adiciona 0.1 mL de lisina a una concentración apropiada para una concentración final de 0.2 – 4.8 mM.

La Figura 11a muestra el protocolo inicial en la cual se resalta que la lisina es el reactivo que se adiciona al final para dar inicio a la detección de Hg^{2+} . En el caso de los ensayos de absorción, se monitoreó el espectro UV-Visible de la muestra en el rango de 450 - 800 nm a diferentes tiempos (0 - 30 min) luego de iniciada la reacción con la adición de lisina. En el caso de los ensayos de dispersión, se monitoreó el espectro de dispersión con un espectrofluorímetro en el rango de 450 - 800 nm a diferentes tiempos de reacción.

5.2.3.2 Protocolo propuesto: Cambio en el orden de adición de los reactivos

Este protocolo es una variación del protocolo inicial en el cual se ha modificado el orden de adición de los reactivos manteniéndose las concentraciones utilizadas en el protocolo inicial. La metodología consiste en colocar 1.25 mL de agua Milli-Q en un vial y adicionar 0.1 mL de lisina y 0.1 mL de Hg^{2+} a las concentraciones seleccionadas. Finalmente, se adiciona 50 μL de AuNPs a la concentración seleccionada para dar inicio a la detección de Hg^{2+} . La Figura 11b muestra el esquema del protocolo propuesto, donde las AuNPs son las que se adicionan al final para dar inicio a la detección de Hg^{2+} . El espectro UV-Visible o de dispersión de la muestra se monitoreó tal como se ha indicado en el protocolo inicial.

5.2.3.3 Protocolo propuesto optimizado: Uso de citrato de sodio

Este protocolo es una modificación del protocolo propuesto, en donde se han mantenido las concentraciones de los reactivos utilizados pero se ha adicionado como nueva variable el uso de citrato de sodio en solución. La metodología consiste en adicionar un volumen de 1 mL de citrato de sodio a una concentración adecuada para obtener una concentración final en el rango de 1 - 20 mM, 0.25 mL de agua Milli-Q, 0.1 mL de Hg^{2+} y 0.1 mL de lisina a las concentraciones seleccionadas. Finalmente se adiciona 50 μL de AuNPs a la concentración seleccionada para dar inicio a la detección de Hg^{2+} . La Figura 11c representa el protocolo optimizado que permitió detectar concentraciones de Hg^{2+} del orden nanomolar.

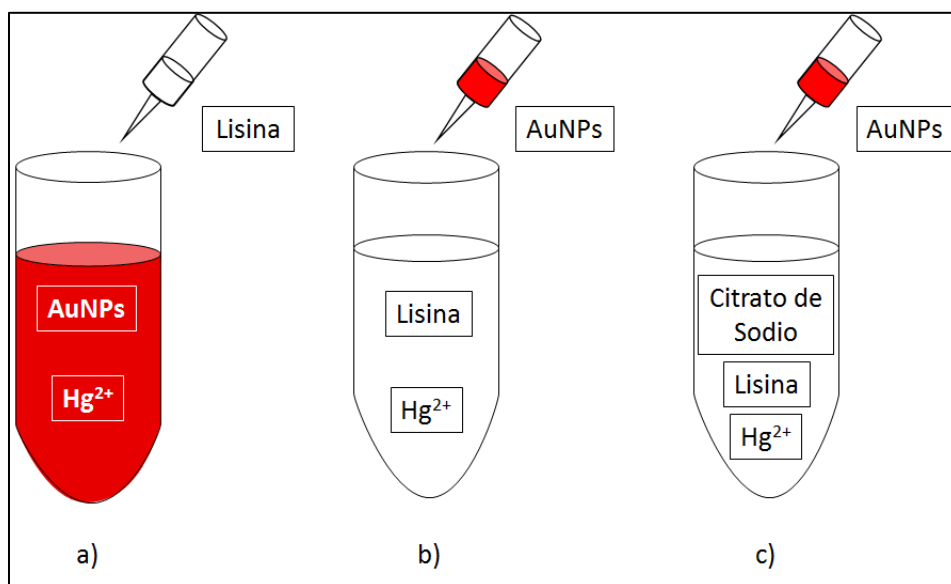


Figura 11. Representación esquemática de los tres protocolos empleados para la cuantificación de Hg^{2+} . a) Esquema del protocolo inicial de detección de Hg^{2+} . b) Esquema del protocolo propuesto para la detección de Hg^{2+} en donde se ha variado el orden de adición de los reactivos. c) Esquema del protocolo propuesto optimizado para la detección de Hg^{2+} en donde se ha adicionado como nueva variable el uso de citrato de sodio.

5.2.4 Estudio de interferentes

El protocolo planteado para el estudio de interferentes es una adaptación del protocolo propuesto optimizado que consiste en adicionar una concentración determinada de un interferente en la mezcla. El estudio de interferentes se ha llevado a cabo en presencia y ausencia de Hg^{2+} manteniéndose las concentraciones y volúmenes de los otros reactivos utilizados en el ensayo. Un esquema de los procedimientos empleados se muestra en la Figura 12.

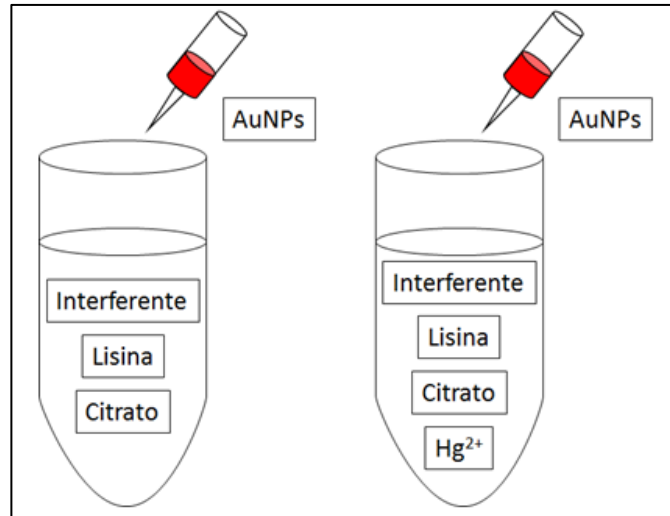


Figura 12. Representación esquemática del protocolo planteado para el estudio de interferentes en ausencia y presencia de Hg^{2+} .

5.3 Resultados experimentales

5.3.1 Caracterización de nanopartículas por espectrofotometría UV-Visible

La síntesis de las AuNPs más pequeñas se realizó por separado de los demás tamaños de partícula (sección 5.2.1). Se determinó el tamaño de éstas en base a la longitud de onda del máximo correspondiente a la banda LSPR (Sección 3.1.3.1) y a los resultados reportados por Conde y Col. [64]. La Figura 13 y la Tabla 2 muestran el espectro UV-Visible y el tamaño estimado de estas AuNPs.

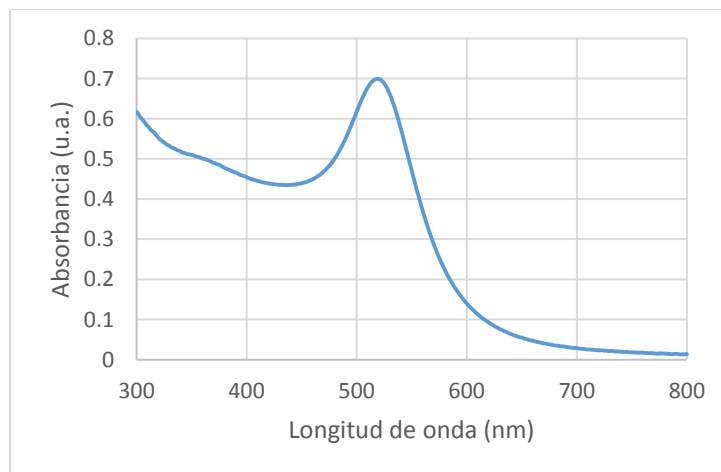


Figura 13. Espectro visible de las AuNPs obtenidas mediante el proceso de síntesis directa.

Tabla 2. Longitud de onda de la banda LSPR y tamaño estimado de las AuNPs más pequeñas. λ_{\max} se refiere a la longitud de onda del máximo de la banda LSPR.

λ_{\max}	Tamaño estimado a partir del λ_{\max}
519 nm	14 nm

En lo que se refiere a las AuNPs de mayor tamaño, el proceso de nucleación y crecimiento permitió obtener cinco tamaños diferentes de AuNPs. Los diferentes tamaños obtenidos se nombraron como $g_0 + 2Au$, $g_1 + 2Au$, $g_2 + 2Au$, $g_3 + 2Au$ y $g_4 + 2Au$, según se ha descrito en la sección 5.2.1 las cuales están ordenadas de menor a mayor tamaño de partícula respectivamente. Los espectros UV-Visible se presentan en la Figura 14 y los tamaños estimados en la Tabla 3.

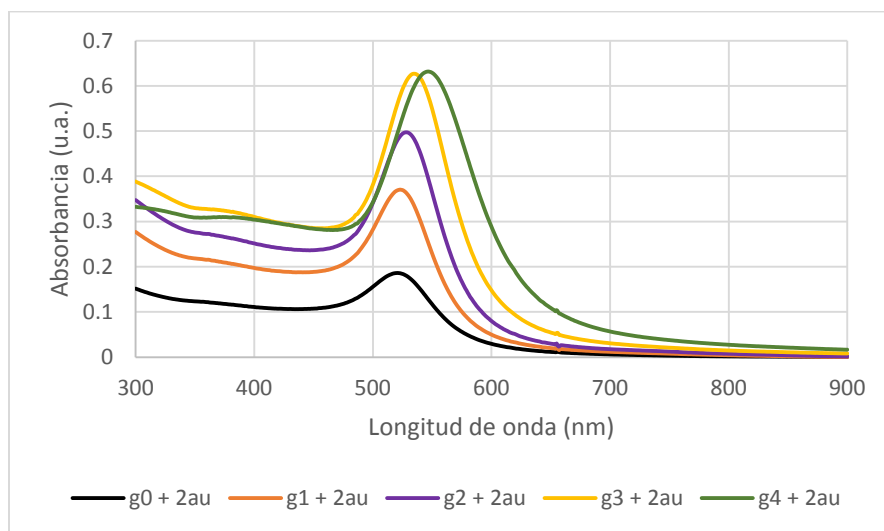


Figura 14. Espectros visibles de las AuNPs sintetizadas mediante el proceso de nucleación y crecimiento.

Tabla 3. Longitud de onda de la banda LSPR y tamaño estimado de las AuNPs sintetizadas por el proceso de nucleación y crecimiento.

AuNPs	λ_{\max} (nm)	Diámetro estimado a partir del λ_{\max} (nm)
$g_0 + 2Au$	521	18
$g_1 + 2Au$	523	24
$g_2 + 2Au$	528	42
$g_3 + 2Au$	536	60
$g_4 + 2Au$	547	78

A partir de los resultados obtenidos, se decidió escoger las AuNPs de aproximadamente 14, 42 y 78 nm de diámetro para estudiar el efecto del tamaño de las AuNPs en la detección de Hg^{2+} .

La determinación de la concentración de las AuNPs esféricas sintetizadas se realizó en base a los coeficientes de absorptividad molar a 450 nm reportados por Haiss y col. siendo estos últimos presentados en la Tabla 4.

Tabla 4. Coeficientes de absorptividad molar de las AuNPs seleccionadas.

Tamaño de AuNPs (nm)	Coeficientes de absorptividad molar ϵ_{450} ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)
14	$1.76 \times 10^{+8}$
42	$5.74 \times 10^{+9}$
78	$3.64 \times 10^{+10}$

5.3.2 Estudio de detección de Hg^{2+} con AuNPs de 14 nm de diámetro

5.3.2.1 Pruebas preliminares de interacción entre los reactivos utilizados

Teniendo en cuenta que la detección de Hg^{2+} se realiza basándonos en la mezcla de AuNPs, Hg^{2+} y lisina, resulta importante conocer cómo influye cada uno de estos componentes por separado en el espectro UV-Visible de las AuNPs.

Las condiciones de los experimentos diseñados para estudiar la interacción entre reactivos se resumen en la Tabla 5 y los espectros obtenidos tras 30 min de interacción se muestran en la Figura 15.

Tabla 5. Pruebas preliminares de interacción entre los reactivos utilizados.

Experimento	Concentración de AuNPs (nM)	Concentración de Hg^{2+} (μM)	Concentración de lisina (mM)
1	0.43	10	-
2	0.43	-	0.8
3	0.43	10	0.8

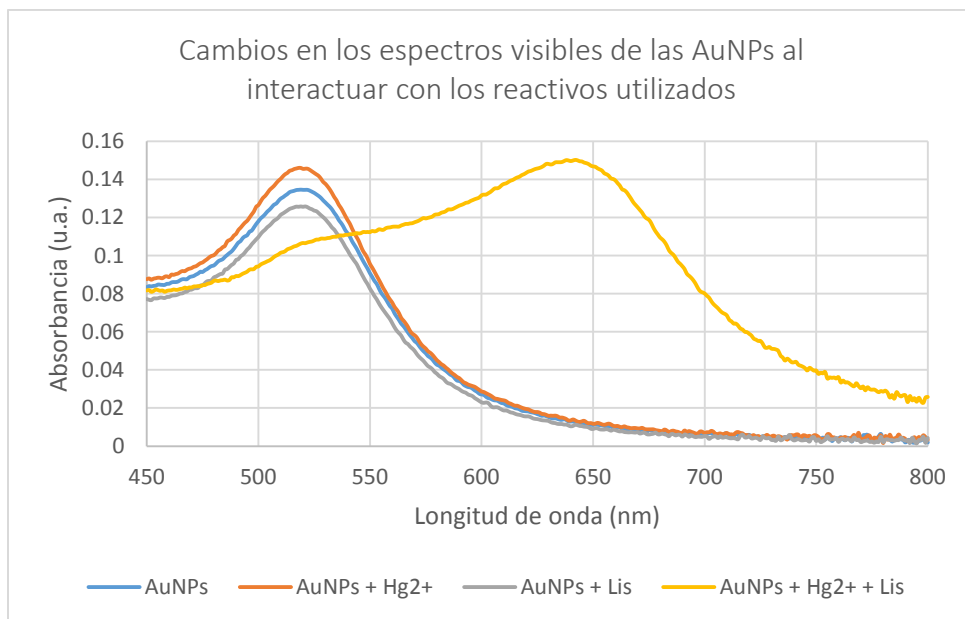


Figura 15. Espectros visibles de los experimentos de interacción entre los reactivos. La leyenda AuNPs se refiere al espectro de las nanopartículas antes de la adición de los otros reactivos. Los espectros se midieron a los 30 minutos de interacción entre los reactivos. La adición de los reactivos se realizó en el orden establecido por el protocolo inicial.

Como se puede apreciar en los resultados obtenidos, la adición de lisina a las AuNPs no produce un cambio en el espectro UV-Visible de las AuNPs (la disminución de la absorbancia se debe únicamente al efecto de dilución). Por otro lado, cuando se hace interactuar las AuNPs con Hg²⁺ se llega a producir un cambio en el espectro UV-Visible de las AuNPs que se muestra como un levantamiento del espectro y un desplazamiento ligero del LSPR hacia una longitud de onda más baja, lo cual se debe posiblemente a los cambios en la composición y el ambiente químico de las AuNPs que afectan el LSPR. Finalmente, la interacción de las AuNPs con Hg²⁺ y lisina induce la agregación de las nanopartículas, lo cual se refleja en el desplazamiento del máximo del LSPR a una longitud de onda mayor (640 nm).

5.3.2.2 Efecto de la concentración de AuNPs en detección de Hg²⁺

Con los resultados obtenidos, se comenzaron los experimentos de detección de Hg²⁺ siguiendo el protocolo inicial (sección 5.2.3.1). Partiendo de una concentración fija de AuNPs y lisina se llevaron a cabo experimentos variando la concentración de Hg²⁺ (Tabla 6) en donde se ha mantenido el tiempo de contacto AuNPs – Hg²⁺ en 30 minutos. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 16.

Tabla 6. Experimentos iniciales para detectar Hg^{2+} con AuNPs de 14 nm.

Experimento	Concentración de AuNPs (nM)	Concentración de Hg^{2+} (μM)	Concentración de lisina (mM)
1	1.38	10	0.8
2	1.38	5	0.8
3	1.38	2.5	0.8
4	1.38	0	0.8

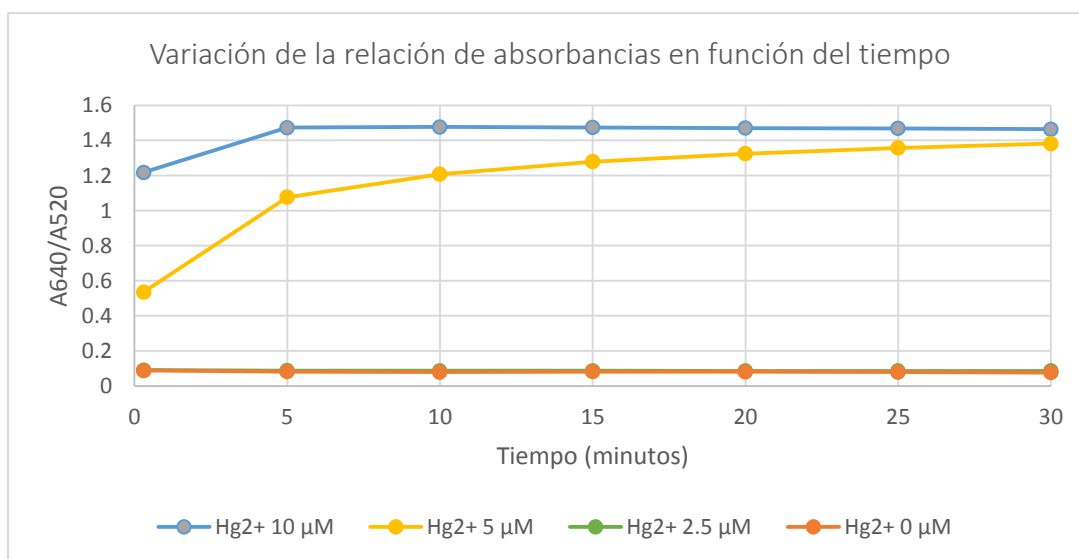


Figura 16. Relación de absorbancias $A_{640\text{nm}}/A_{520\text{nm}}$ en función del tiempo para los experimentos de detección de diferentes concentraciones de Hg^{2+} utilizando AuNPs de 14 nm a una concentración de 1.38 nM.

Como se puede apreciar con estas condiciones experimentales, al utilizar una concentración de AuNPs de 1.38 nM (la que designamos como alta), es posible distinguir concentraciones de Hg^{2+} mayores o iguales a 5 μM .

Con los resultados obtenidos, se procedió a plantear una serie de experimentos disminuyendo la concentración de AuNPs para ver si mejoraba la señal (Tabla 7) en donde se ha mantenido el tiempo de contacto AuNPs – Hg^{2+} en 30 minutos. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 17.

Tabla 7. Experimentos para detectar Hg^{2+} utilizando AuNPs de 14 nm 0.43 nM.

Experimento	Concentración de AuNPs (nM)	Concentración de Hg^{2+} (μM)	Concentración de lisina (mM)
1	0.43	3	0.8
2	0.43	2.5	0.8
3	0.43	2	0.8
4	0.43	1.5	0.8
5	0.43	1	0.8
6	0.43	0	0.8

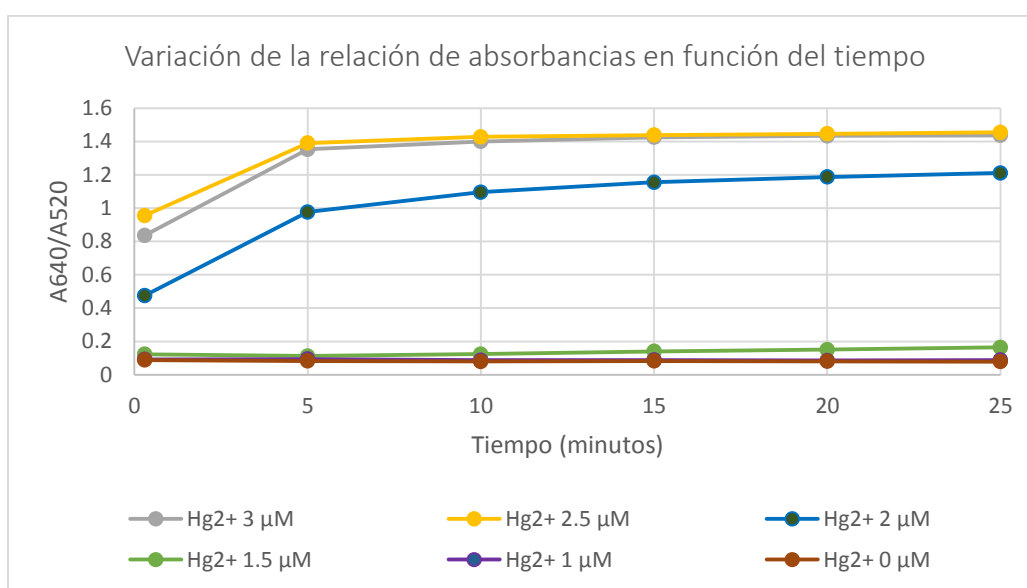


Figura 17. Relación de absorbancias A_{640nm}/A_{520nm} en función del tiempo para la detección de diferentes concentraciones de Hg^{2+} utilizando AuNPs de 14 nm a una concentración de 0.43 nM.

Como se puede apreciar en la Figura 17 al disminuir la concentración de AuNPs, fue posible determinar cantidades de Hg^{2+} menores a las que se detectaron utilizando una concentración de AuNPs 1.38 nM. A partir de este resultado se decidió mantener la concentración de AuNPs en 0.43 nM. En estas condiciones la absorbancia a 450 nm tenía un valor de 0.08, por lo que no consideró conveniente disminuir más la concentración para minimizar el efecto del ruido instrumental.

5.3.2.3 Efecto de la concentración de lisina en la detección de Hg^{2+}

Una vez establecido que es conveniente usar concentraciones bajas de AuNPs, se procedió a realizar el estudio de detección de Hg^{2+} variando la concentración de lisina mantenido el tiempo de contacto AuNPs – Hg^{2+} en 30 minutos. Los experimentos planteados para este estudio se resumen en la Tabla 8 y los resultados obtenidos se presentan en la Figura 18.

Tabla 8. Experimentos para evaluar el efecto de la concentración de lisina en la detección de Hg^{2+} .

Experimento	Concentración de AuNPs (nM)	Concentración de Hg^{2+} (μM)	Concentración de lisina (mM)
1	0.43	2	4.8
2	0.43	2	3.6
3	0.43	2	2.4
4	0.43	2	1.2
5	0.43	2	0.8
6	0.43	2	0.4
7	0.43	2	0.2

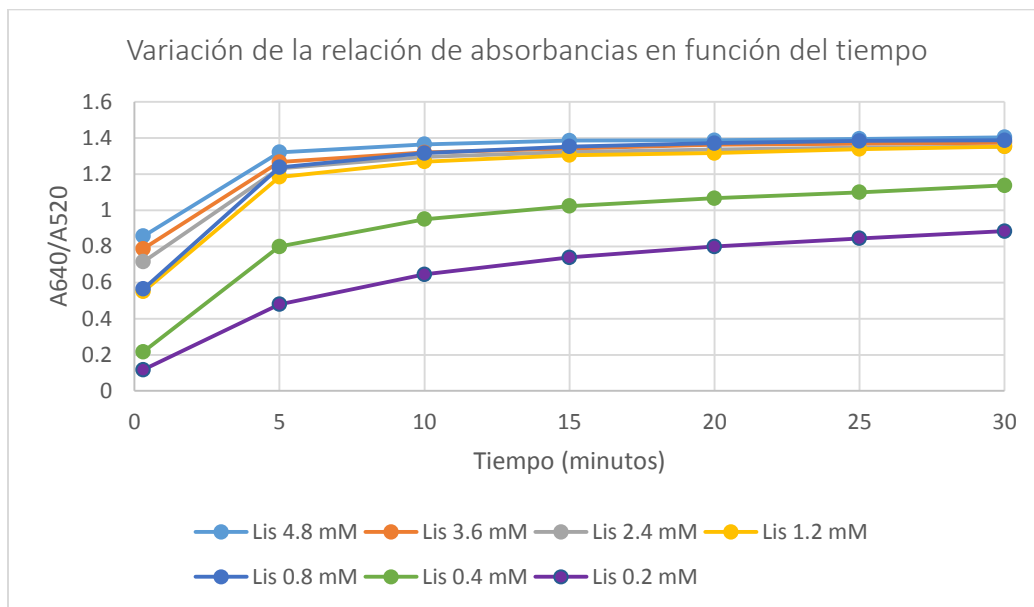


Figura 18. Relación de absorbancias $A_{640\text{nm}}/A_{520\text{nm}}$ en función del tiempo para la determinación de la concentración óptima aparente de lisina que permitirá detectar Hg^{2+} en agua.

A partir de los resultados mostrados en la Figura 18, se determinó que la adición de una concentración de lisina mayor a 0.8 mM no afecta de manera considerable la detección de Hg^{2+} 2 μM , mientras que cuando la concentración de lisina disminuye por debajo de 0.8 mM, la respuesta del sensor es más lenta y la señal obtenida es menor. Con lo mencionado anteriormente, se fijó la concentración de lisina óptima para los ensayos en 0.8 mM.

5.3.2.4 Efecto del tiempo de contacto entre AuNPs y Hg^{2+} previo a la adición de lisina

Dado que hasta este último análisis los parámetros de variación de concentración de AuNPs y lisina se habían estudiado obteniendo muy buenos resultados, se procedió a realizar estudios del tiempo de contacto AuNPs - Hg^{2+} , planteándose para ello una serie de experimentos (Tabla 9). Los resultados se muestran en la Figura 19.

Tabla 9. Experimentos para evaluar el efecto del tiempo de contacto AuNPs - Hg^{2+} en la detección de Hg^{2+} .

Experimento	Concentración de AuNPs (nM)	Tiempo de contacto AuNPs - Hg^{2+} (minutos)	Concentración de Hg^{2+} (μ M)	Concentración de lisina (mM)
1	0.43	30	1.5	0.8
2	0.43	10	1.5	0.8
3	0.43	5	1.5	0.8
4	0.43	1	1.5	0.8

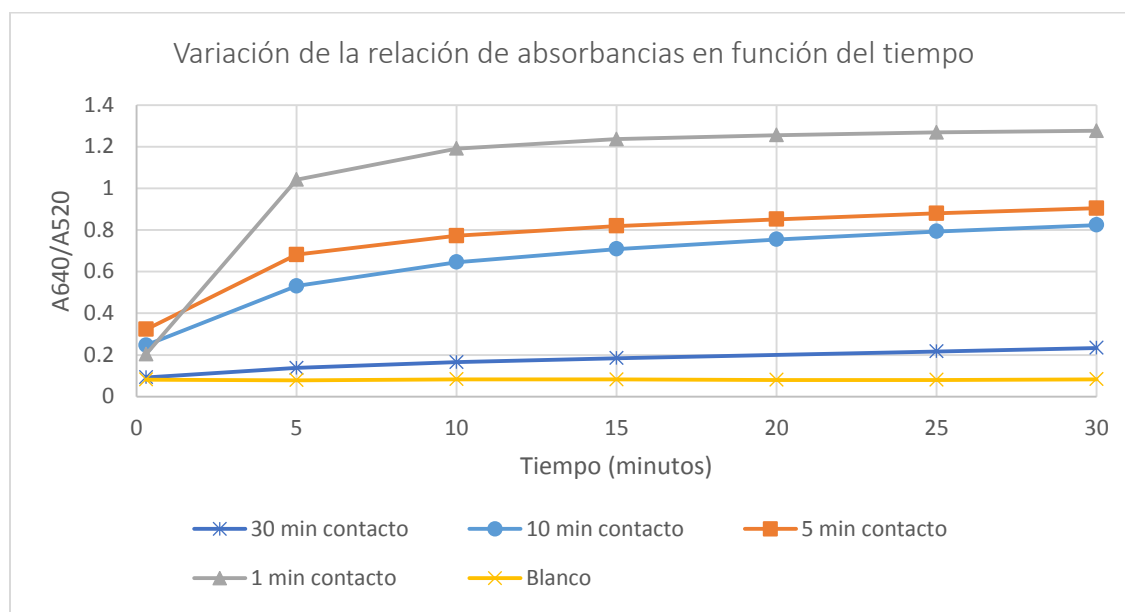


Figura 19. Relación de absorbancias A_{640nm}/A_{520nm} en función del tiempo para evaluar la influencia del tiempo de contacto entre las AuNPs y el Hg^{2+} . Se empleó Hg^{2+} 1.5 μ M.

A partir de estos resultados, se puede precisar que el tiempo de contacto entre las AuNPs y Hg^{2+} tiene una gran influencia en la detección de este último, siendo preferible un tiempo de contacto lo más corto posible.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, se procedió a realizar un experimento en el cual se mezclaría inicialmente el Hg^{2+} con lisina y la reacción se iniciaría cuando se adicionara las AuNPs (protocolo propuesto, sección 5.2.3.2). Los experimentos planteados se presentan en la Tabla 10 y los resultados obtenidos se presentan en la Figura 20.

Tabla 10. Experimentos de comparación entre los protocolos aplicados para la detección de Hg^{2+} .

Experimento	Protocolo	Concentración de AuNPs (nM)	Tiempo de contacto AuNPs- Hg^{2+} (minutos)	Concentración de Hg^{2+} (μM)	Concentración de lisina (mM)
1	Protocolo inicial	0.43	1	1.5	0.8
2	Protocolo propuesto	0.43	-	1.5	0.8

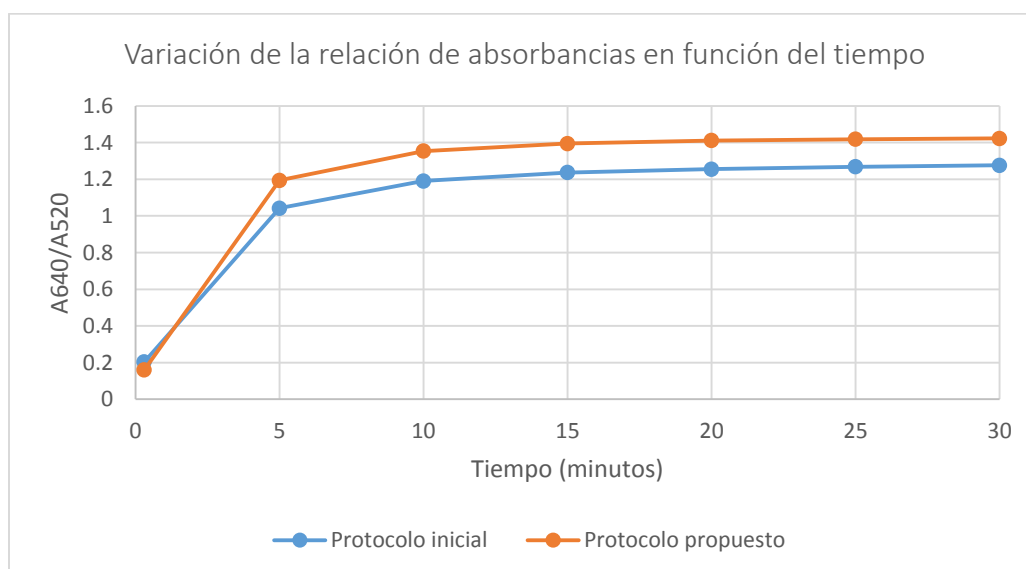


Figura 20. Relación de absorbancias $A_{640\text{nm}}/A_{520\text{nm}}$ en función del tiempo para ensayos realizados siguiendo el protocolo inicial y el protocolo propuesto. Se empleó Hg^{2+} 1.5 μM y lisina 0.8 nM.

Dada la mejora de los resultados obtenida al emplear el protocolo propuesto, se planteó una serie de experimentos de detección de Hg^{2+} empleando dicho protocolo, en el cual no hay tiempo de contacto entre AuNPs y Hg^{2+} . Los experimentos realizados se resumen en la Tabla 11 y los resultados obtenidos se muestran en la Figura 21.

Tabla 11. Experimentos para detectar concentraciones menores que 1.5 μM de Hg^{2+} aplicando el protocolo propuesto.

Experimento	Concentración de AuNPs (nM)	Concentración de Hg^{2+} (μM)	Concentración de lisina (mM)
1	0.43	1.5	0.8
2	0.43	0.5	0.8
3	0.43	0.25	0.8
4	0.43	0	0.8

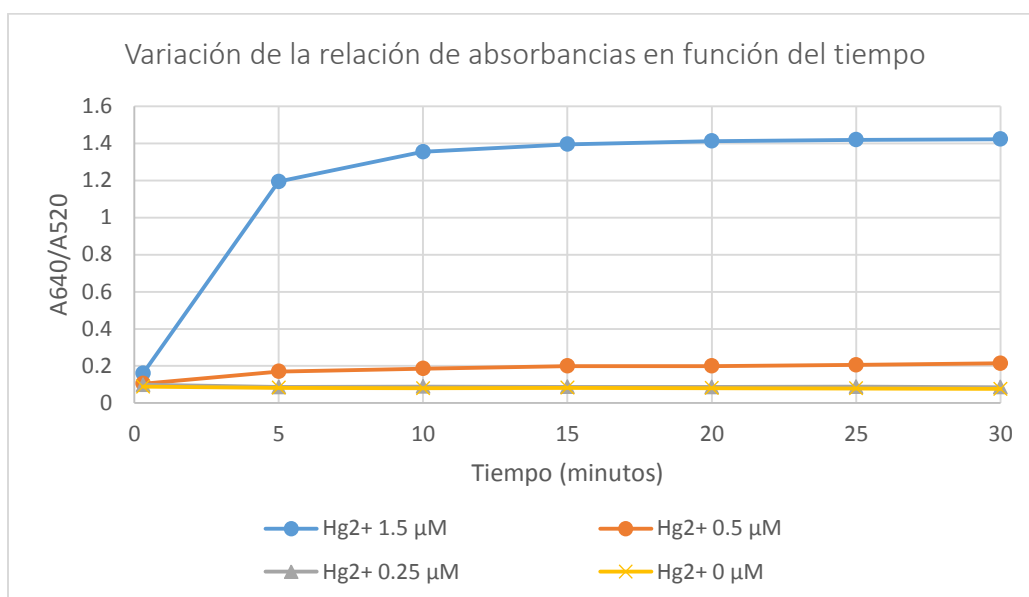


Figura 21. Relación de absorbancias $A_{640\text{nm}}/A_{520\text{nm}}$ en función del tiempo para la detección de concentraciones de Hg^{2+} menores que 1.5 μM aplicando el protocolo propuesto.

Los resultados obtenidos muestran que con el protocolo propuesto es posible detectar una concentración 0.5 μM de Hg^{2+} .

5.3.2.5 Efecto de la concentración de citrato de sodio

Teniendo en cuenta que con las modificaciones realizadas hasta el momento no se habían podido detectar cantidades menores a 0.5 μM de Hg^{2+} , se procedió a realizar experimentos adicionando citrato de sodio a la mezcla de reacción (protocolo propuesto optimizado).

A partir de lo reportado por Ojea y col. se plantea como hipótesis que la presencia de mayor cantidad de citrato de sodio favorezca la reducción de Hg^{2+} debido a que las AuNPs que se han usado hasta el momento podrían no tener la cantidad suficiente de citrato en su superficie para reducir de manera efectiva al ion Hg^{2+} [65]. Los experimentos planteados para evaluar la influencia del uso de citrato de sodio se resumen en la Tabla 12 y los resultados obtenidos se muestran en la Figura 22.

Tabla 12. Experimentos comparativos para ver la influencia del citrato de sodio en la detección de Hg^{2+} 0.5 μM .

Experimento	Concentración de Citrato de sodio (mM)	Concentración de AuNPs (nM)	Concentración de Hg^{2+} (μM)	Concentración de lisina (mM)
1	0	0.43	0.5	0.8
2	5	0.43	0.5	0.8

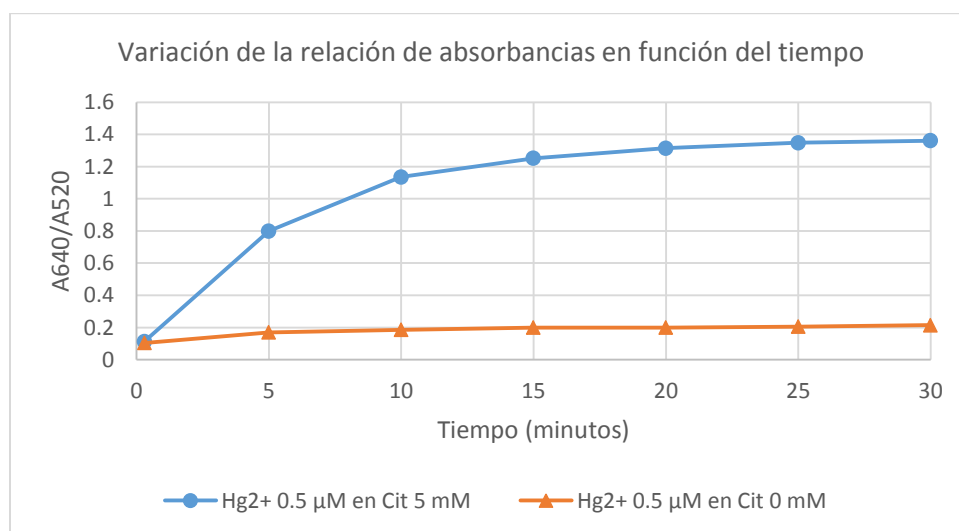


Figura 22. Relación de absorbancias $A_{640\text{nm}}/A_{520\text{nm}}$ en función del tiempo de los experimentos para evaluar la detección de Hg^{2+} 0.5 μM con AuNPs de 14 nm utilizando citrato de sodio.

Dado los buenos resultados obtenidos utilizando citrato de sodio en la detección de Hg^{2+} , se realizaron experimentos disminuyendo la concentración de Hg^{2+} , mostrados en la Tabla 13. Los resultados obtenidos se resumen en la Figura 23.

Tabla 13. Detección de concentraciones de Hg^{2+} menores a 500 nM utilizando citrato de sodio 5 mM.

Experimento	Concentración de AuNPs (nM)	Concentración de Hg^{2+} (nM)	Concentración de lisina (mM)
1	0.43	500	0.8
2	0.43	250	0.8
3	0.43	100	0.8
4	0.43	0	0.8

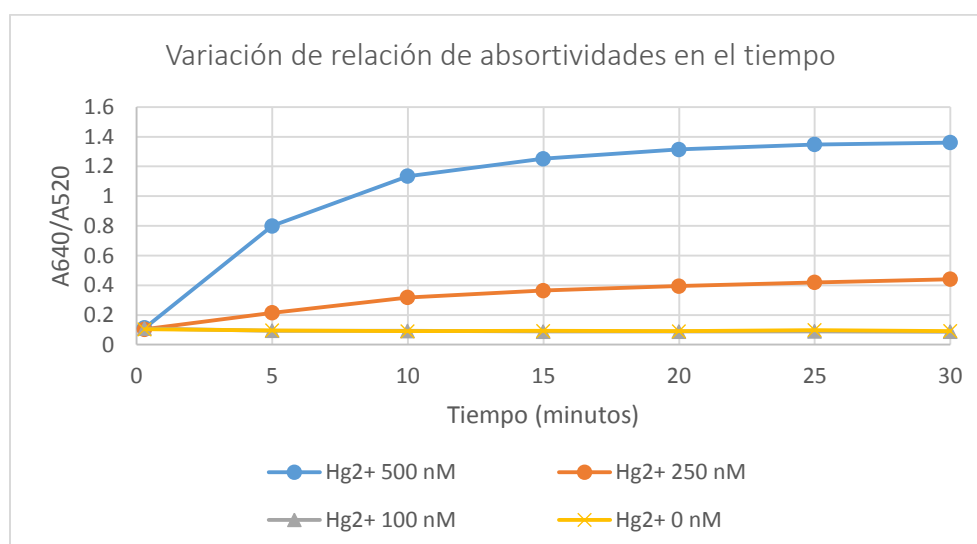


Figura 23. Relación de absorbancias A_{640nm}/A_{520nm} en función del tiempo para la detección de diferentes concentraciones de Hg^{2+} utilizando citrato de sodio 5 mM.

Dado que la respuesta al utilizar citrato de sodio resultó ser positiva para la detección de cantidades más bajas de Hg^{2+} , se procedió a realizar experimentos aumentando la concentración de citrato de sodio manteniendo una concentración fija de Hg^{2+} de 100 nM. Los experimentos realizados se resumen en la Tabla 14 y los resultados obtenidos se muestran en la Figura 24.

Tabla 14. Experimentos para evaluar la concentración de citrato de sodio óptima para la detección de concentraciones bajas de Hg^{2+} utilizando AuNPs de 14 nm.

Experimento	Concentración de Citrato de sodio (mM)	Concentración de AuNPs (nM)	Concentración de Hg^{2+} (nM)	Concentración de lisina (mM)
1	5	0.43	100	0.8
2	10	0.43	100	0.8
3	20	0.43	100	0.8

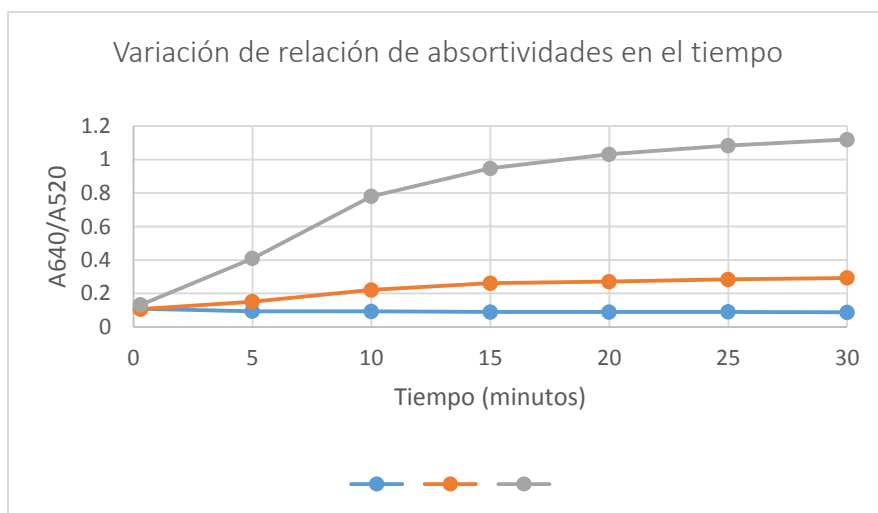


Figura 24. Relación de absorbancias $A_{640\text{nm}}/A_{520\text{nm}}$ en función del tiempo para la detección de Hg^{2+} 100 nM utilizando diferentes concentraciones de citrato de sodio.

Teniendo en cuenta que una concentración de citrato de sodio de 20 mM permitió detectar una concentración de Hg^{2+} 100 nM, se decidió utilizar dicha concentración de citrato de sodio para obtener la curva de calibración de Hg^{2+} tanto por absorción como por dispersión de luz.

5.3.2.6 Curva de calibración de Hg^{2+} mediante medidas de absorción

Para el caso de la curva de calibración por espectrofotometría UV-Visible, se plantearon los experimentos mostrados en la Tabla 15. Los experimentos se realizaron por triplicado y los espectros se midieron cada minuto en un intervalo desde los 5 a los 15 minutos de reacción. Los resultados se muestran en las Figuras 25, 26 y 27.

Tabla 15. Experimentos para obtener la curva de calibración de Hg^{2+} por absorción utilizando las AuNPs de 14 nm y citrato de sodio 20 mM.

Experimento	Concentración de AuNPs (nM)	Concentración de Hg^{2+} (nM)	Concentración de lisina (mM)
1	0.43	0	0.8
2	0.43	10	0.8
3	0.43	25	0.8
4	0.43	50	0.8
5	0.43	75	0.8
6	0.43	100	0.8
7	0.43	150	0.8
8	0.43	200	0.8
9	0.43	500	0.8

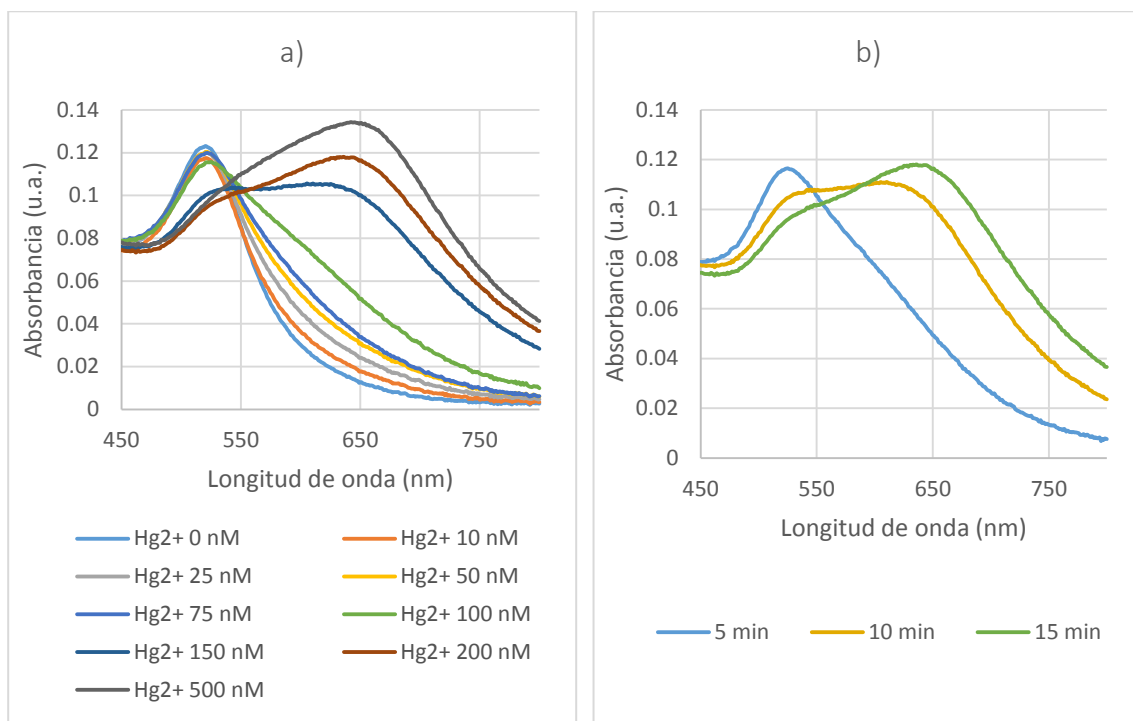


Figura 25. Espectros visibles para diferentes concentraciones de Hg²⁺ utilizando AuNPs de 14 nm y el protocolo propuesto optimizado. a) Espectros visibles a los 15 minutos de reacción utilizando AuNPs de 14 nm y b) Variación en el tiempo del espectro visible de las AuNPs en la detección de Hg²⁺ 200 nM.

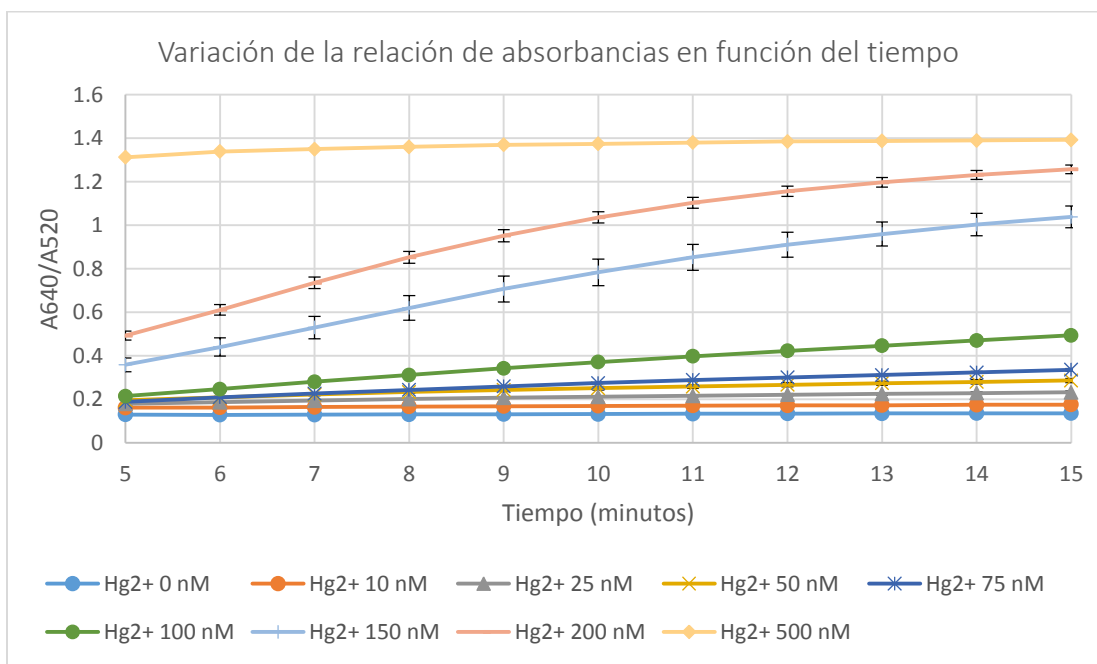


Figura 26. Relación de absorbancias A_{640nm}/A_{520nm} en función del tiempo para diferentes concentraciones de Hg²⁺ utilizando AuNPs de 14 nm y el protocolo propuesto optimizado. Las barras de error representan \pm el error estándar de la media.

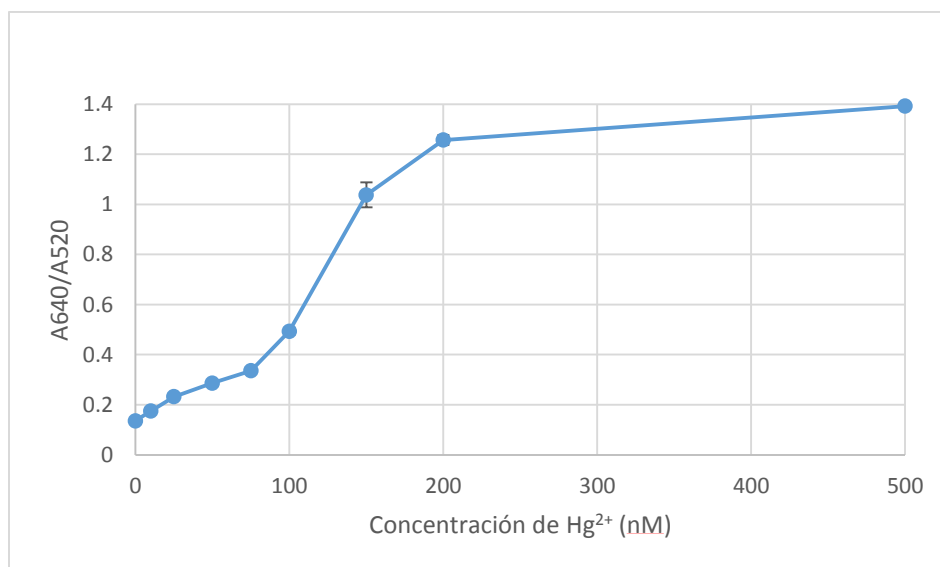


Figura 27. Curva de calibración de Hg²⁺ por espectrofotometría UV-Visible a los 15 minutos de reacción utilizando AuNPs de 14 nm y el protocolo propuesto optimizado. Las barras de error representan \pm el error estándar de la media.

5.3.2.7 Curva de calibración de Hg²⁺ mediante medidas de dispersión de luz

Con todos los parámetros ya optimizados, se procedió a realizar la curva de calibración de Hg²⁺ en base a medidas de DRR. Los experimentos realizados para detectar diferentes concentraciones de Hg²⁺ se presentan en la Tabla 16. Los experimentos fueron realizados por triplicado y las lecturas se realizaron cada minuto por 10 minutos de reacción. Los resultados se muestran en las Figuras 28, 29 y 30.

Tabla 16. Experimentos para obtener las curvas de calibración de Hg²⁺ por DRR utilizando AuNPs de 14 nm y una concentración de citrato de sodio 20 mM.

Experimento	Concentración de AuNPs (nM)	Concentración de Hg ²⁺	Concentración de lisina (mM)
1	0.43	0 nM	0.8
2	0.43	10 nM	0.8
3	0.43	25 nM	0.8
4	0.43	50 nM	0.8
5	0.43	75 nM	0.8
6	0.43	100 nM	0.8
7	0.43	250 nM	0.8
8	0.43	500 nM	0.8
9	0.43	1 μ M	0.8

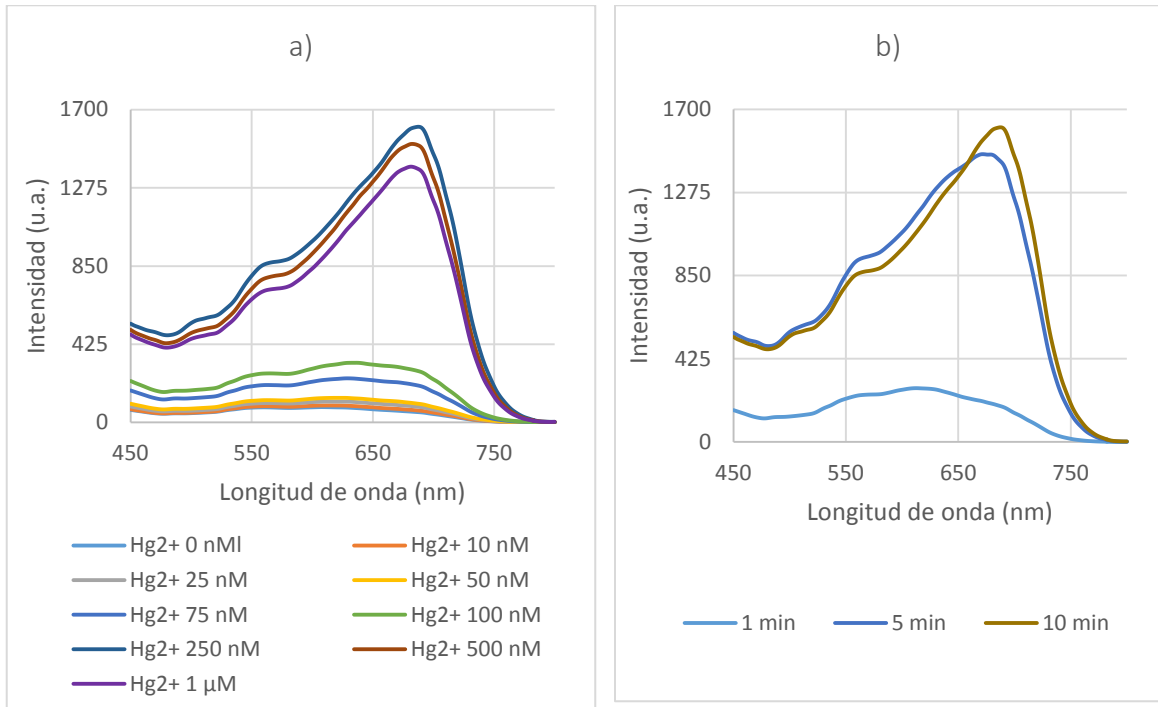


Figura 28. Espectros de dispersión para diferentes concentraciones de Hg²⁺ utilizando AuNPs de 14 nm y el protocolo propuesto optimizado. a) Espectros de dispersión a los 10 minutos de reacción y b) variación en el tiempo del espectro de dispersión de las AuNPs en la detección de Hg²⁺ 250 nM.

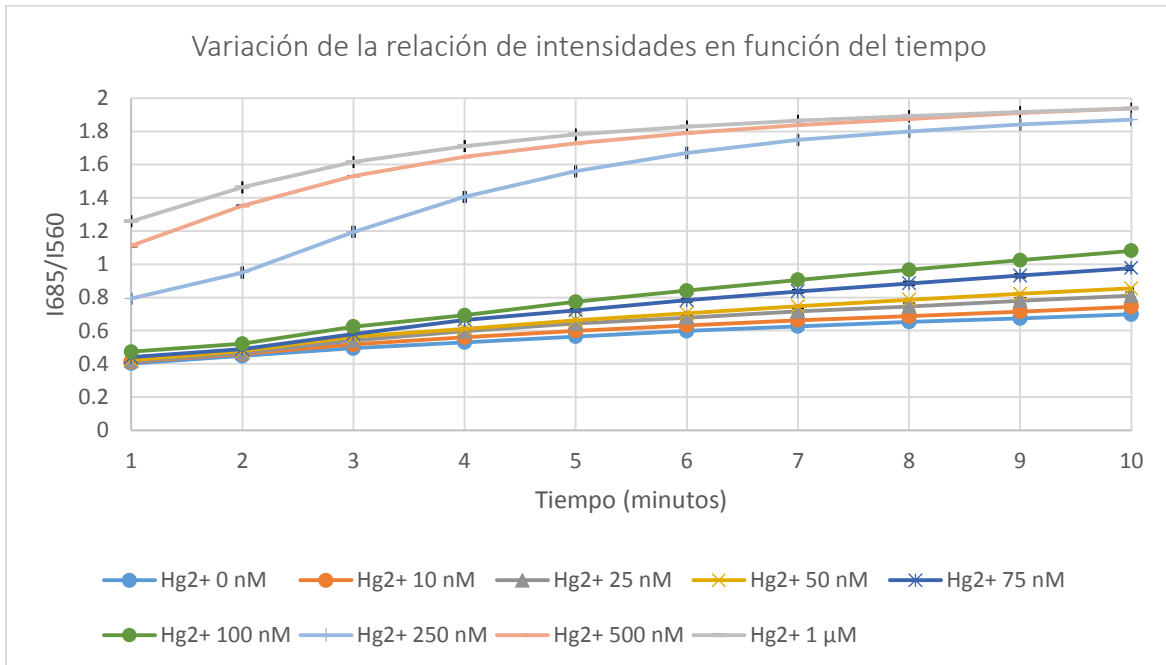


Figura 29. Relación de intensidades I_{685nm}/I_{560nm} en función del tiempo de los experimentos para diferentes concentraciones de Hg²⁺ utilizando AuNPs de 14 nm y el protocolo propuesto optimizado. Las barras de error representan \pm el error estándar de la media.

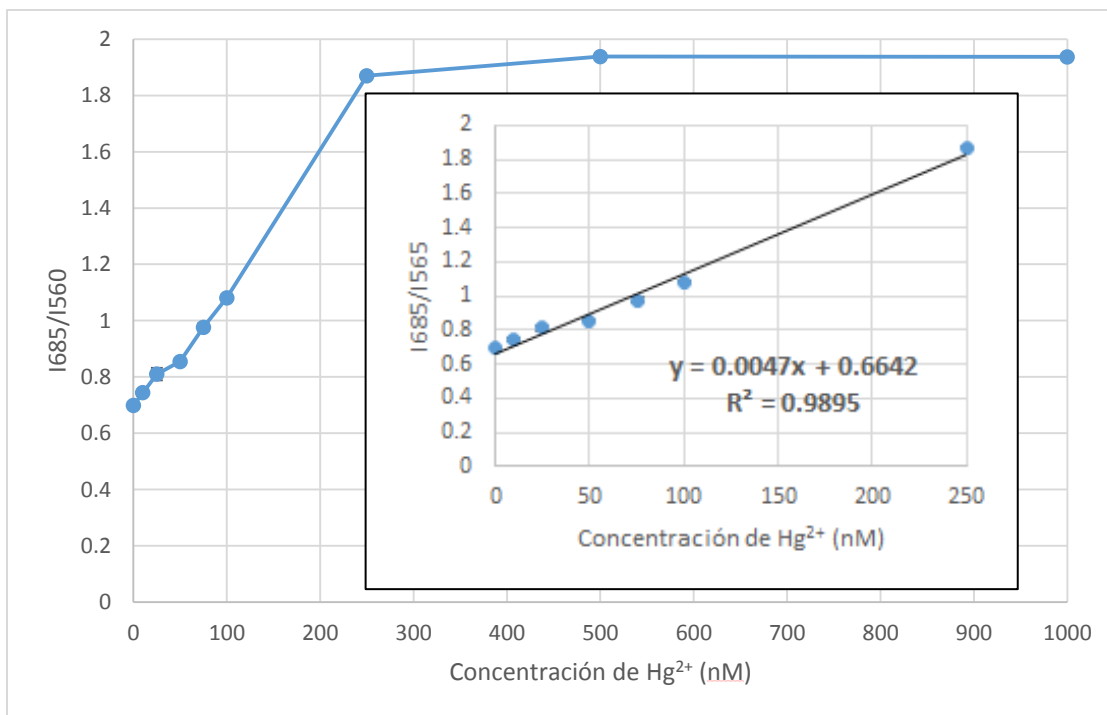


Figura 30. Curva de calibración de Hg²⁺ por DRR a los 10 minutos de reacción utilizando AuNPs de 14 nm y el protocolo propuesto optimizado. El *inset* muestra la respuesta lineal del ensayo a bajas concentraciones de Hg²⁺. Las barras de error representan \pm el error estándar de la media.

A partir de los resultados obtenidos para las curvas de calibración Hg²⁺ por absorción y dispersión de luz, se puede notar que bajo las condiciones experimentales propuestas se ha logrado determinar en ambos casos una concentración de Hg²⁺ de hasta 10 nM.

5.3.3 Estudio de detección de Hg²⁺ con AuNPs de 42 nm de diámetro

Se procedió a estudiar el efecto del tamaño de partícula en el ensayo de detección de Hg²⁺ utilizando el protocolo propuesto optimizado y condiciones similares a las empleadas anteriormente con AuNPs de otros tamaños.

Cabe resaltar que se hicieron experimentos para determinar el efecto de la concentración de las AuNPs en la detección de Hg²⁺ obteniéndose como resultado que menor concentración de AuNPs permite detectar menores concentraciones de Hg²⁺ (resultado análogo al obtenido con las AuNPs de 14 nm, los resultados no se muestran en este documento).

5.3.3.1 Pruebas preliminares de interacción entre los reactivos utilizados

Inicialmente se realizaron estudios de interacción similares a los realizados a las AuNPs de 14 nm utilizando en este caso una concentración de 12.9 pM de AuNPs y estudiando la interacción tanto con lisina como con Hg^{2+} por separado y cuando los tres componentes se encuentran presentes. Los experimentos realizados se resumen en la Tabla 17 y los resultados obtenidos se muestran en la Figura 31.

Tabla 17. Pruebas preliminares de interacción entre los reactivos utilizados.

Experimento	Concentración de AuNPs (pM)	Concentración de Hg^{2+} (μM)	Concentración de lisina (mM)
1	12.9	10	-
2	12.9	-	0.8
3	12.9	10	0.8

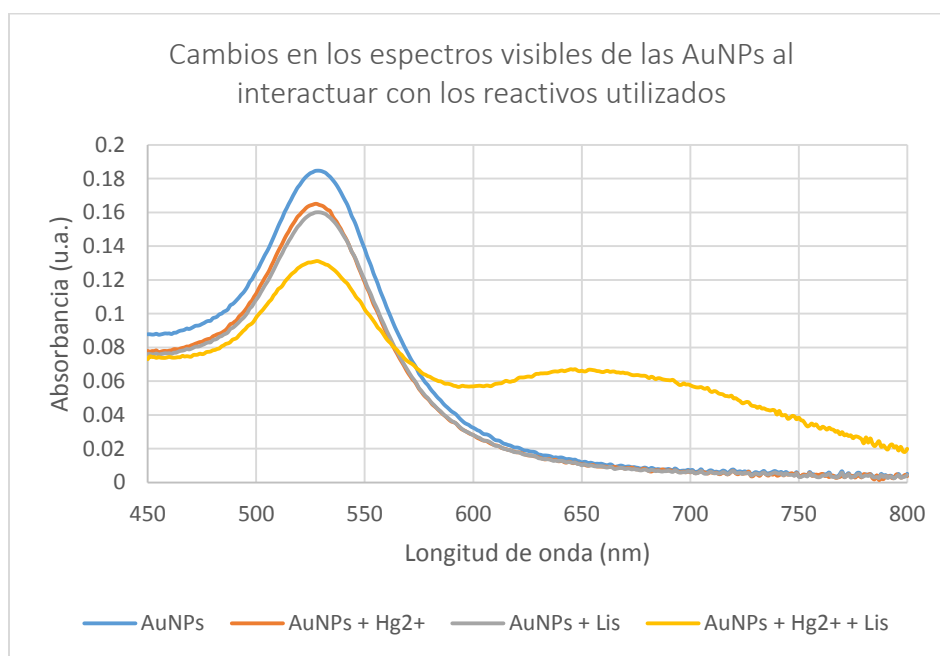


Figura 31. Espectros visibles para el estudio de interacción entre los reactivos utilizados. La leyenda AuNPs se refiere al espectro de las nanopartículas antes de la adición de los otros reactivos. La adición de los reactivos se realizó según el protocolo propuesto optimizado. Los espectros se midieron a los 30 minutos de interacción entre los reactivos.

Para este tamaño de partícula, los resultados mostraron que ni la adición de lisina ni de Hg^{2+} (por separado) a las concentraciones utilizadas inducen un cambio en el espectro visible. Por otra parte, la interacción de las AuNPs con Hg^{2+} y lisina produce un cambio apreciable en el espectro visible de las AuNPs produciéndose un desplazamiento de la LSPR a longitudes de onda mayores.

5.3.3.2 Efecto de la concentración de citrato de sodio

Teniendo en cuenta que estas AuNPs son de un mayor tamaño, se procedió a realizar experimentos que mostraran cómo afecta el citrato de sodio a las AuNPs en ausencia de Hg^{2+} . Los experimentos planteados se resumen en la Tabla 18 y los resultados obtenidos se muestran en la Figura 32.

Tabla 18. Experimentos para evaluar la estabilidad de las AuNPs de 42 nm en presencia de diferentes concentraciones de citrato de sodio.

Experimento	Concentración de AuNPs (pM)	Concentración de Citrato de sodio (mM)
1	12.9	0
2	12.9	1
3	12.9	5
4	12.9	10
5	12.9	20

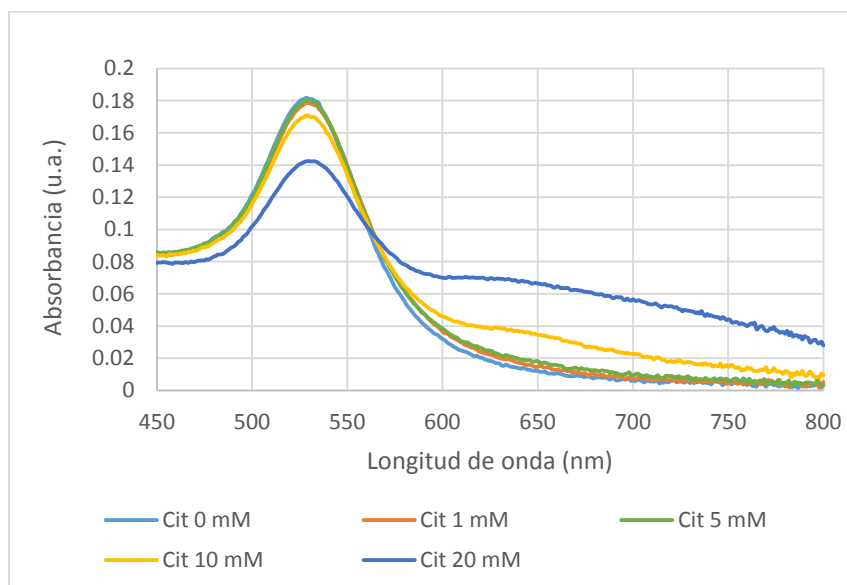


Figura 32. Espectros visibles de las AuNPs de 42 nm con diferentes concentraciones de citrato de sodio en ausencia de Hg^{2+} . Las mediciones se realizaron a los 10 minutos de contacto entre los reactivos.

Se observaron drásticos cambios en el espectro al usar citrato de sodio 20 mM, por lo que resultó necesario utilizar una concentración menor de citrato de sodio para evitar un drástico incremento de la señal en ausencia de Hg^{2+} . En primera instancia, se realizaron las mediciones utilizando citrato de sodio 5 mM pues los cambios en el espectro UV-Visible son casi imperceptibles. Los experimentos planteados se muestran en la Tabla 19.

Tabla 19. Experimentos para detectar concentraciones de Hg^{2+} menores a 500 nM utilizando AuNPs de 42 nm y una concentración de citrato de sodio 5 mM.

Experimento	Concentración de AuNPs (pM)	Concentración de Hg^{2+} (nM)	Concentración de lisina (mM)
1	12.9	250	0.8
2	12.9	100	0.8
3	12.9	50	0.8
4	12.9	0	0.8

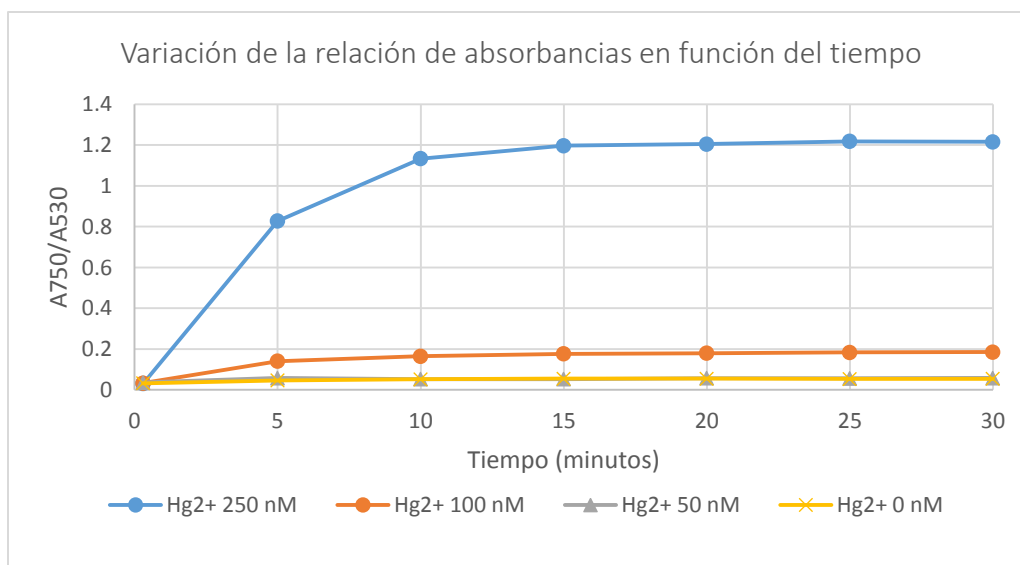


Figura 33. Relación de absorbancias $A_{750\text{nm}}/A_{530\text{nm}}$ en función del tiempo para la detección de Hg^{2+} con AuNPs de 42 nm y citrato de sodio 5 mM.

A continuación, se procedió a realizar una comparación de la detección de Hg^{2+} 100 nM utilizando citrato de sodio 5 y 10 mM para evaluar si era posible aumentar la señal incrementando la concentración del agente reductor. Los experimentos realizados se resumen en la Tabla 20.

Tabla 20. Experimentos de detección de Hg^{2+} 100 nM utilizando diferentes concentraciones de citrato de sodio.

Experimento	Concentración de Citrato de sodio (mM)	Concentración de AuNPs (pM)	Concentración de Hg^{2+} (nM)	Concentración de lisina (mM)
1	5	12.9	100	0.8
2	10	12.9	100	0.8

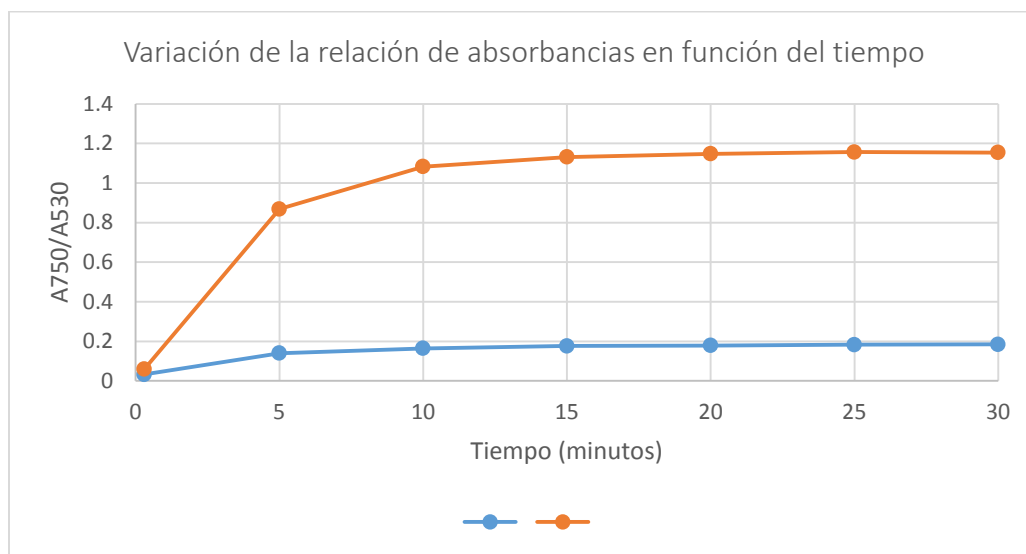


Figura 34. Relación de absorbancias $A_{750\text{nm}}/A_{530\text{nm}}$ en función del tiempo para la detección de Hg^{2+} 100 nM utilizando AuNPs de 42 nm y diferentes concentraciones de citrato de sodio.

Los resultados obtenidos indican que una concentración de citrato de sodio 10 mM incrementa notablemente la señal. Esto corrobora lo obtenido en el estudio de AuNPs de 14 nm, es decir, que una mayor concentración de citrato de sodio permite detectar concentraciones más bajas de Hg^{2+} . Sin embargo, cuando la cantidad de citrato de sodio sobrepasa un valor determinado (en este caso 10 mM) se producen alteraciones importantes al espectro visible de las AuNPs utilizadas incluso en ausencia de Hg^{2+} (se agregan lentamente), lo cual alteraría nuestro blanco de referencia drásticamente.

Con los resultados obtenidos hasta el momento, se procedió a realizar las curvas de calibración por absorción y dispersión de luz utilizando las AuNPs de 42 nm y citrato de sodio 10 mM.

5.3.3.3 Curva de calibración de Hg^{2+} mediante medidas de absorción

Para obtener la curva de calibración por espectrofotometría UV-Visible se plantearon los experimentos mostrados en la Tabla 21, los cuales se realizaron por triplicado y midieron cada minuto por 10 minutos de reacción. Los resultados se muestran en las Figuras 35, 36 y 37.

Tabla 21. Experimentos para obtener la curva de calibración de Hg^{2+} por espectrofotometría UV-Visible utilizando AuNPs de 42 nm y una concentración de citrato de sodio 10 mM.

Experimento	Concentración de AuNPs (pM)	Concentración de Hg^{2+}	Concentración de lisina (mM)
1	12.9	0 nM	0.8
2	12.9	10 nM	0.8
3	12.9	25 nM	0.8
4	12.9	50 nM	0.8
5	12.9	75 nM	0.8
6	12.9	100 nM	0.8
7	12.9	250 nM	0.8
8	12.9	1 μM	0.8
9	12.9	2 μM	0.8

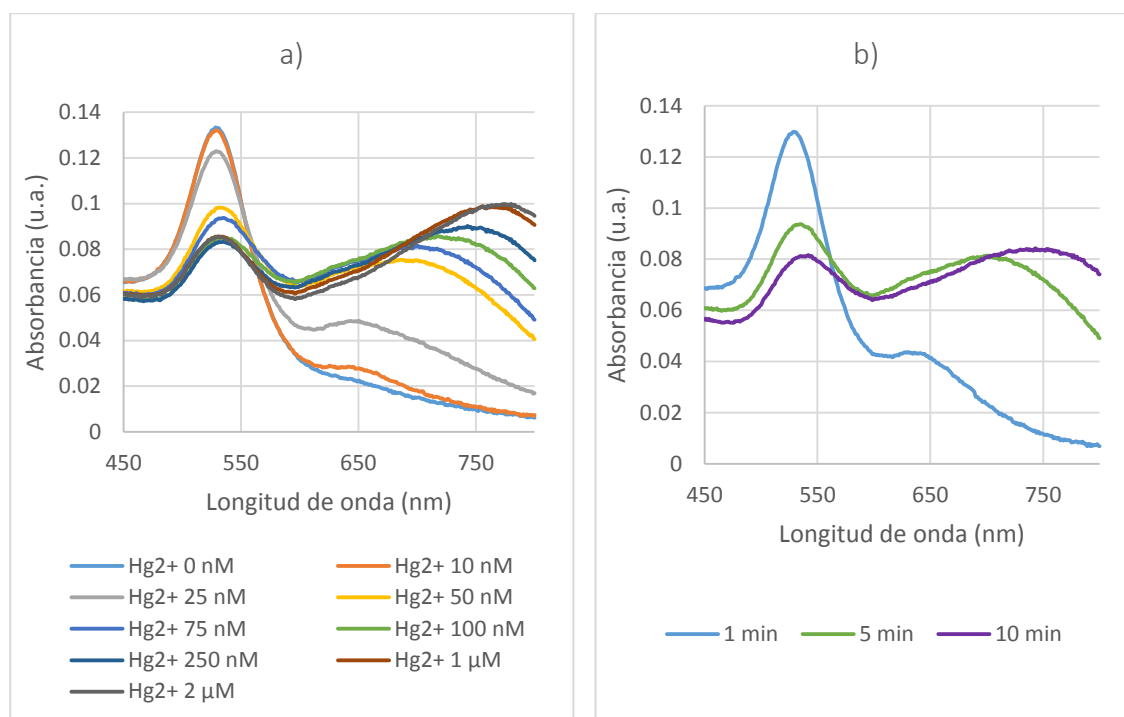


Figura 35. Espectros visibles para diferentes concentraciones de Hg^{2+} utilizando AuNPs de 42 nm y el protocolo propuesto optimizado. a) Espectros visibles a los 5 minutos de reacción utilizando AuNPs de 42 nm y b) variación en el tiempo del espectro visible de las AuNPs en la detección de Hg^{2+} 75 nM.

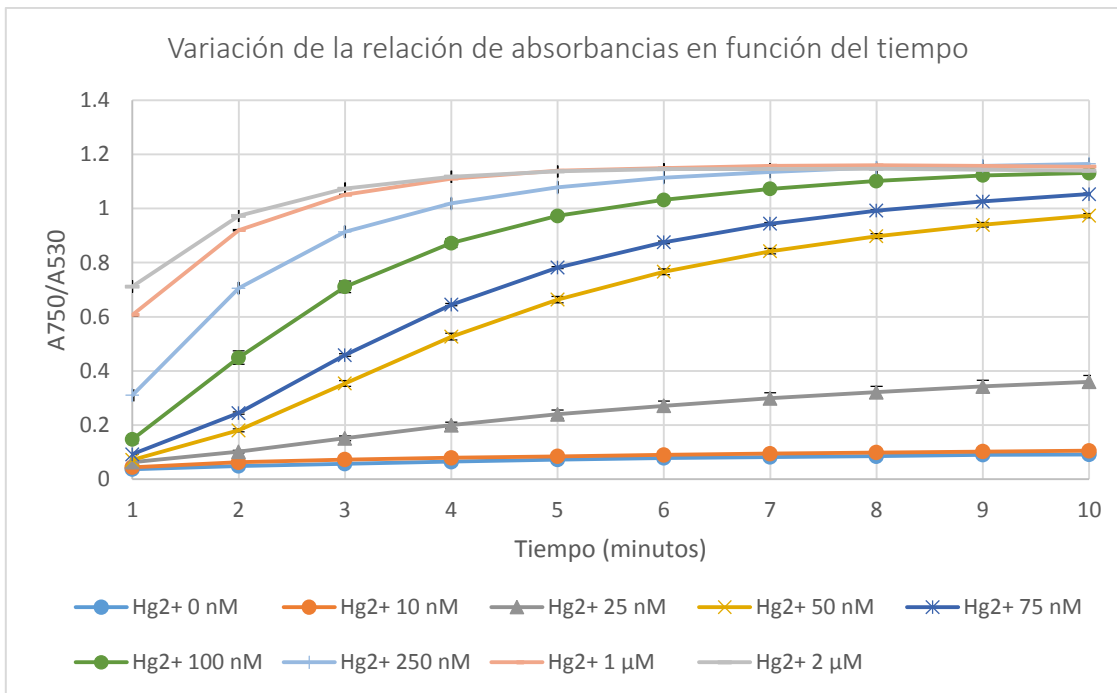


Figura 36. Relación de absorbancias $A_{750\text{nm}}/A_{530\text{nm}}$ en función del tiempo para diferentes concentraciones de Hg^{2+} utilizando AuNPs de 42 nm y el protocolo propuesto optimizado. Las barras de error representan \pm el error estándar de la media.

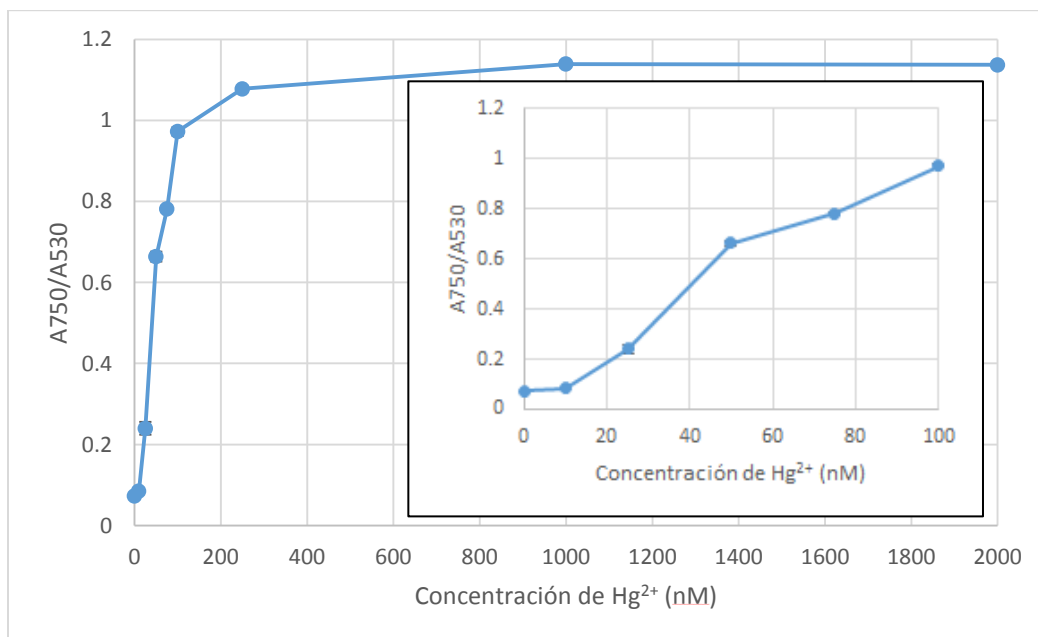


Figura 37. Curva de calibración de Hg^{2+} por espectrofotometría UV-Visible a los 5 minutos de reacción utilizando AuNPs de 42 nm y el protocolo propuesto optimizado. Las barras de error representan \pm el error estándar de la media.

Como se puede apreciar en los resultados obtenidos, las condiciones experimentales establecidas han permitido detectar concentraciones de Hg^{2+} de hasta 25 nM.

5.3.3.4 Curva de calibración de Hg^{2+} mediante medidas de dispersión de luz

De manera similar a la curva de absorción, se procedió a realizar la curva de calibración de Hg^{2+} en base a medidas de DRR. Los experimentos realizados para detectar diferentes concentraciones de Hg^{2+} se presentan en la Tabla 22. Cada experimento fue realizado por triplicado y las lecturas se realizaron cada minuto por 10 minutos de reacción. Los resultados se muestran en las Figuras 38, 39 y 40.

Tabla 22. Experimentos para obtener las curvas de calibración de Hg^{2+} por DRR utilizando AuNPs de 42 nm y una concentración de citrato de sodio 10 mM.

Experimento	Concentración de AuNPs (pM)	Concentración de Hg^{2+}	Concentración de lisina (mM)
1	12.9	0 nM	0.8
2	12.9	10 nM	0.8
3	12.9	25 nM	0.8
4	12.9	50 nM	0.8
5	12.9	75 nM	0.8
6	12.9	100 nM	0.8
7	12.9	250 nM	0.8
8	12.9	1 μM	0.8
9	12.9	2 μM	0.8

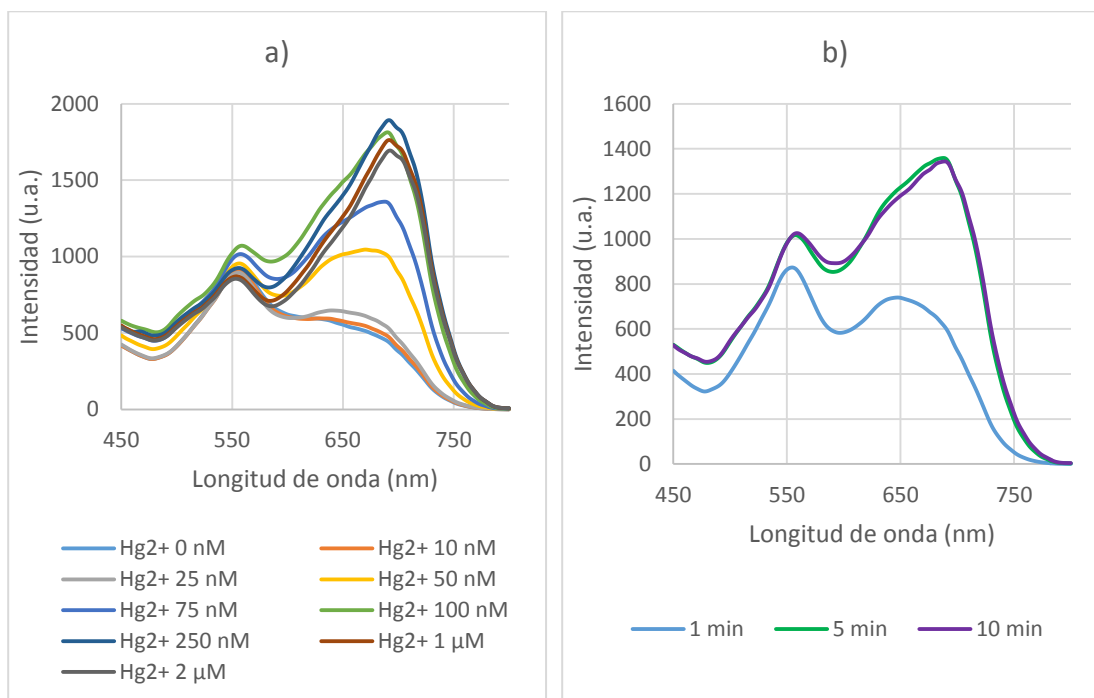


Figura 38. Espectros de dispersión para diferentes concentraciones de Hg^{2+} utilizando AuNPs de 42 nm y el protocolo propuesto optimizado. a) Espectros de dispersión a los 5 minutos de reacción y b) variación en el tiempo del espectro de dispersión de las AuNPs en la detección de Hg^{2+} 75 nM.

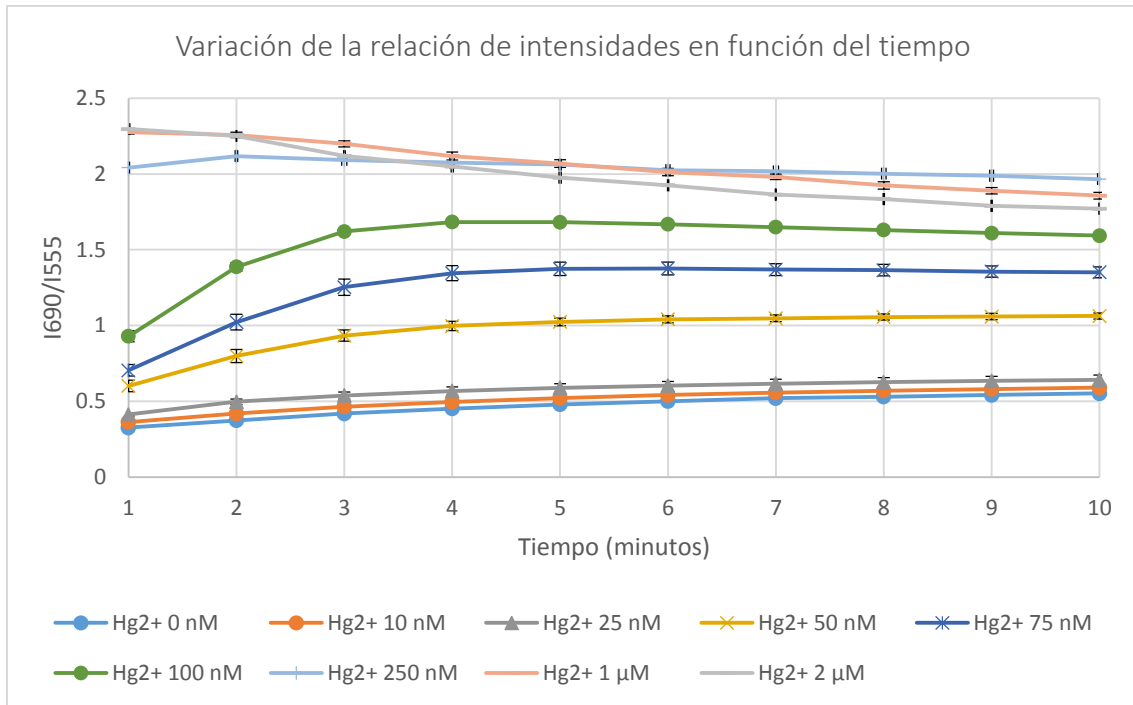


Figura 39. Relación de intensidades I_{690nm}/I_{555nm} en función del tiempo de los experimentos para diferentes concentraciones de Hg^{2+} utilizando AuNPs de 42 nm y el protocolo propuesto optimizado. Las barras de error representan \pm el error estándar de la media.

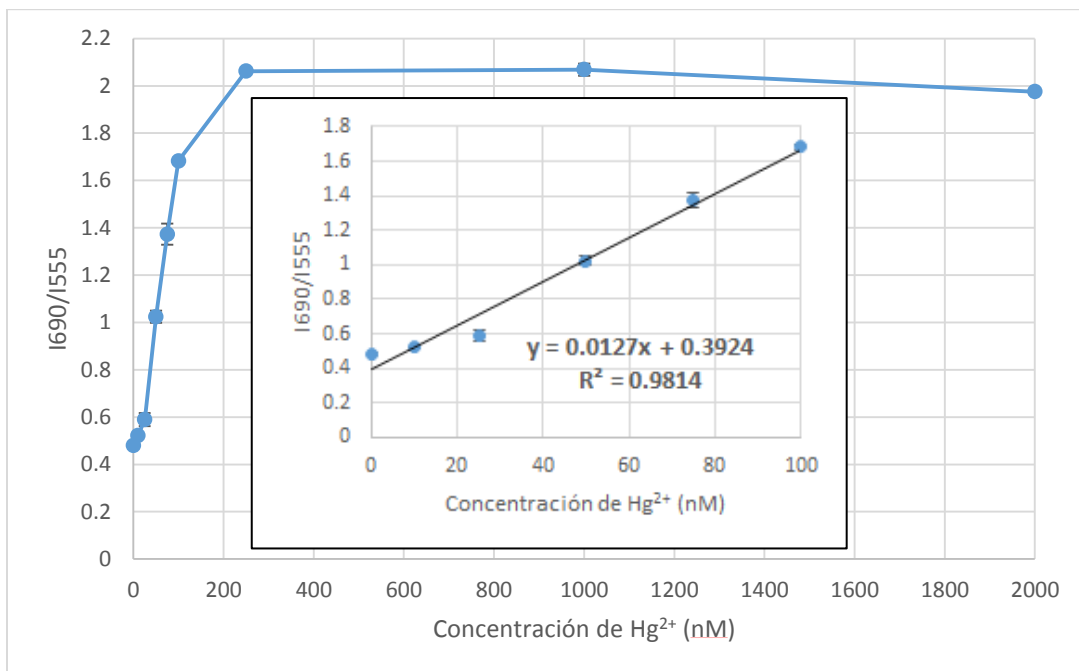


Figura 40. Curva de calibración de Hg^{2+} por DRR a los 5 minutos de reacción utilizando AuNPs de 42 nm y el protocolo propuesto optimizado. El *inset* muestra la respuesta lineal del ensayo a bajas concentraciones de Hg^{2+} . Las barras de error representan \pm el error estándar de la media.

Como se puede apreciar en los resultados obtenidos, las condiciones experimentales establecidas han permitido detectar concentraciones de Hg^{2+} de hasta 10 nM para el caso de DRR.

5.3.4 Estudio de detección de Hg^{2+} con AuNPs de 78 nm de diámetro

Para llevar a cabo los estudios de detección con las AuNPs de 78 nm se mantuvieron las condiciones experimentales óptimas que se encontraron en los estudios realizados con las AuNPs de 14 y 42 nm de diámetro utilizando para ello el protocolo propuesto optimizado. En lo que se refiere a la concentración de las AuNPs a utilizarse se planteó hacer uso de una concentración baja de AuNPs. Adicionalmente, se mantuvo la condición de utilizar la concentración más alta posible de citrato de sodio que no produzca una agregación drástica de las AuNPs de 78 nm así como mantener la concentración de lisina en 0.8 mM en todo el estudio.

Cabe mencionarse que de manera similar a los otros dos tamaños de AuNPs, se realizaron experimentos para corroborar el efecto de la concentración de AuNPs en la detección de Hg^{2+} , obteniéndose la misma tendencia que en los otros dos tamaños de AuNPs (bajas concentraciones de AuNPs permiten detectar cantidades más bajas de Hg^{2+}). Estos resultados obtenidos no se presentan en este documento.

Dado que los estudios de detección que se realizaron con los dos tamaños anteriores de AuNPs permitieron obtener como conclusiones que para detectar cantidades bajas de Hg^{2+} se requiere utilizar citrato de sodio y que esta cantidad a usar debe ser la mayor que no afecte drásticamente la estabilidad de las AuNPs (lo cual se aprecia como cambios en el espectro UV-Visible de éstas), se procedió a realizar inicialmente el estudio de estabilidad de las AuNPs de 78 nm en diferentes concentraciones de citrato de sodio realizando para ello los experimentos mostrados en la Tabla 23.

Tabla 23. Evaluación de la concentración óptima de citrato de sodio a usar en la detección de Hg^{2+} utilizando AuNPs de 78 nm.

Experimento	Concentración de Citrato de sodio (mM)	Concentración de AuNPs (pM)	Concentración de Hg^{2+} (nM)	Concentración de lisina (mM)
1	0	1.88	0	0.8
2	5	1.88	0	0.8
3	10	1.88	0	0.8
4	15	1.88	0	0.8

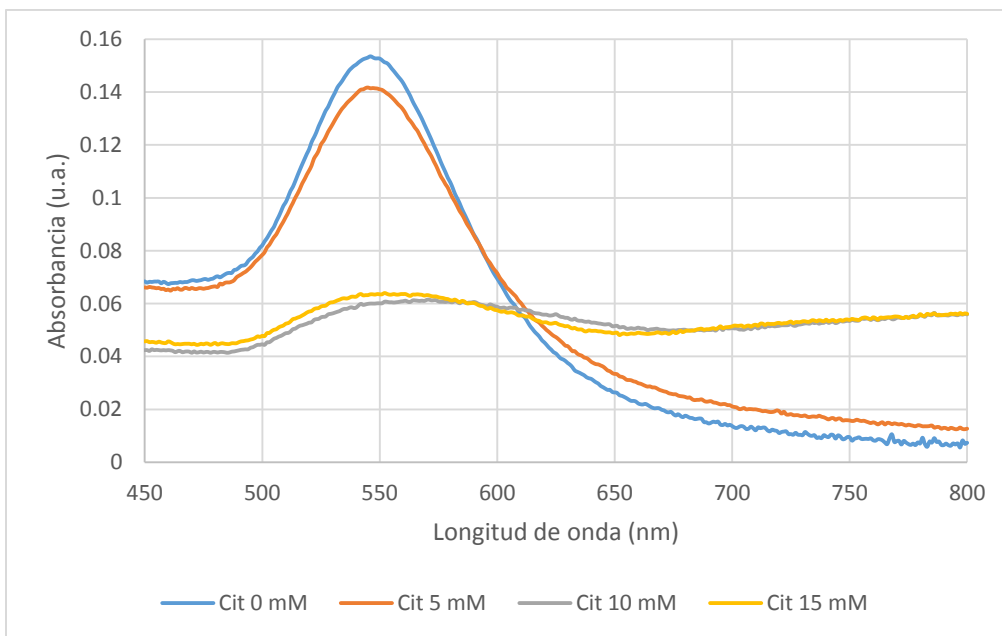


Figura 41. Espectros visibles de las AuNPs de 78 nm al interactuar con diferentes concentraciones de citrato de sodio. Las mediciones se realizaron a los 20 minutos de contacto entre los reactivos.

Como se puede apreciar, una cantidad de citrato de sodio mayor a 5 mM desestabiliza notablemente a las AuNPs de 78 nm por lo cual habría que fijar esta concentración de citrato de sodio como máximo para llevar a cabo los estudios de detección de Hg^{2+} . Finalmente, utilizando las condiciones de citrato de sodio 5 mM, lisina 0.8 mM, una concentración de AuNPs 1.88 μM y utilizando el protocolo optimizado, se procedió a realizar la curva de calibración de Hg^{2+} con este tamaño de partículas en base a medidas de dispersión y de absorción.

5.3.4.1 Curva de calibración de Hg^{2+} mediante medidas de absorción

Los experimentos realizados se muestran en la Tabla 24. Cada ensayo se realizó por triplicado y su espectro se midió cada minuto por 10 minutos de reacción. Los resultados se muestran en las Figuras 42, 43 y 44.

Tabla 24. Experimentos para obtener la curva de calibración de Hg^{2+} por absorción utilizando las AuNPs de 78 nm y una concentración de citrato de sodio 5 mM.

Experimento	Concentración de AuNPs (pM)	Concentración de Hg^{2+}	Concentración de lisina (mM)
1	1.88	0 nM	0.8
2	1.88	10 nM	0.8
3	1.88	25 nM	0.8
4	1.88	50 nM	0.8
5	1.88	75 nM	0.8
6	1.88	100 nM	0.8
7	1.88	250 nM	0.8
8	1.88	1 μ M	0.8
9	1.88	2 μ M	0.8

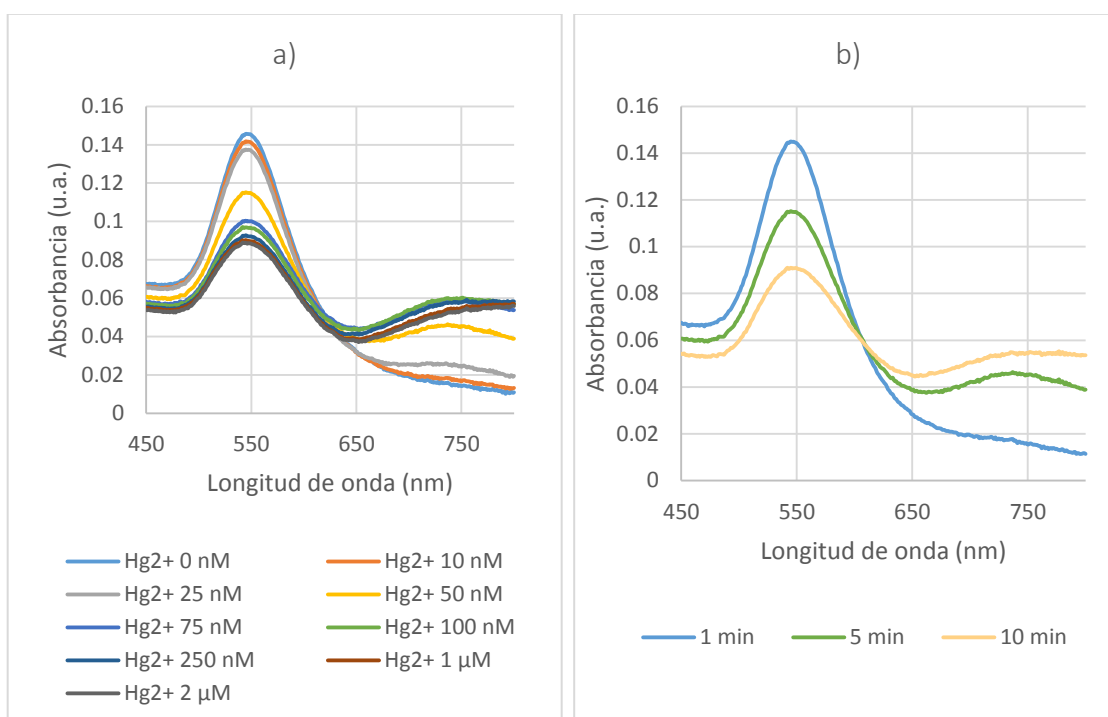


Figura 42. Espectros visibles para diferentes concentraciones de Hg^{2+} utilizando AuNPs de 78 nm y el protocolo propuesto optimizado. a) Espectros visibles a los 5 minutos de reacción utilizando AuNPs de 78 nm y b) variación en el tiempo del espectro visible de las AuNPs en la detección de Hg^{2+} 50 nM.

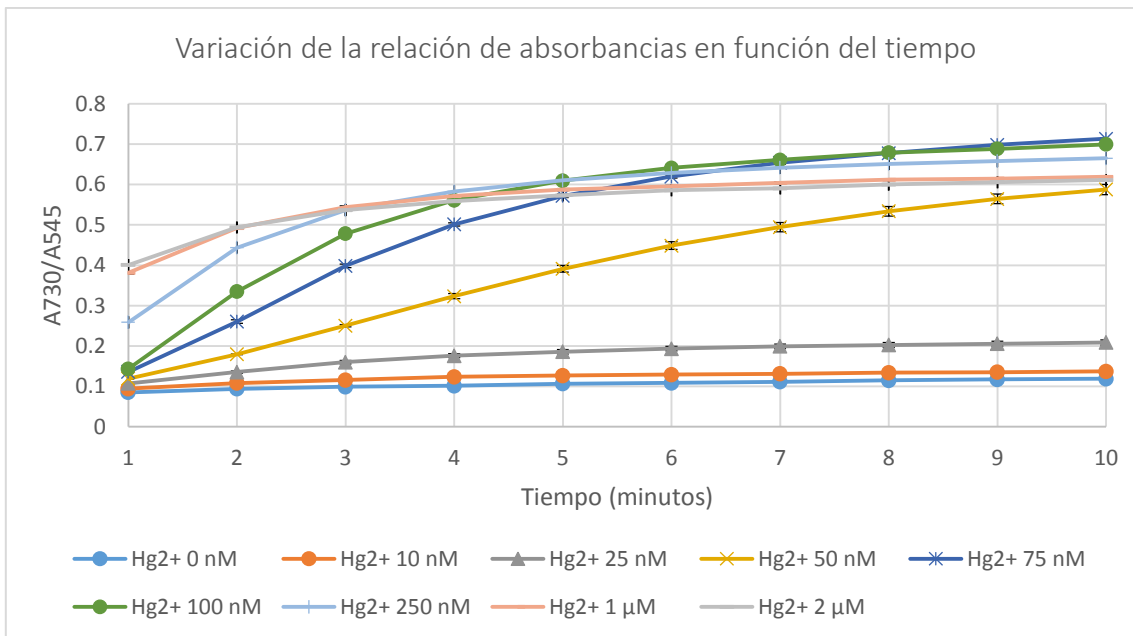


Figura 43. Relación de absorbancias $A_{730\text{nm}}/A_{545\text{nm}}$ en función del tiempo para diferentes concentraciones de Hg^{2+} utilizando AuNPs de 78 nm y el protocolo propuesto optimizado. Las barras de error representan \pm el error estándar de la media.

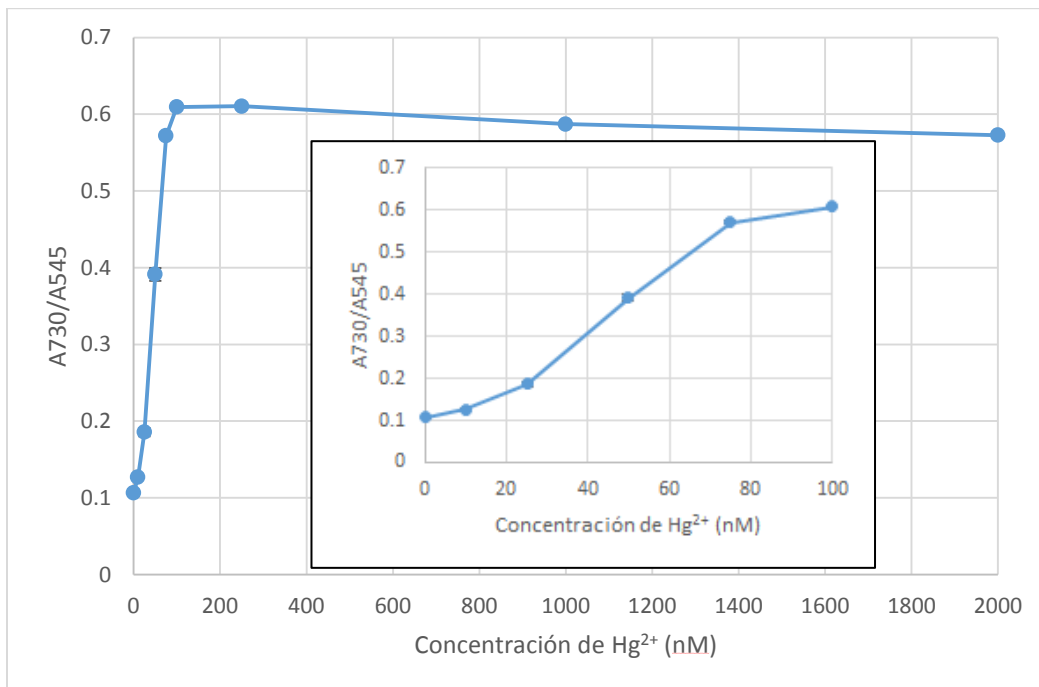


Figura 44. Curva de calibración de Hg^{2+} por espectrofotometría UV-Visible a los 5 minutos de reacción utilizando AuNPs de 78 nm y el protocolo propuesto optimizado. Las barras de error representan \pm el error estándar de la media.

Los resultados para este tamaño de partícula permitieron detectar hasta 10 nM de Hg^{2+} por espectrofotometría UV-Visible.

5.3.4.2 Curva de calibración de Hg^{2+} mediante medidas de dispersión de luz

Tomando como base las curvas de dispersión anteriores y los resultados obtenidos por espectrofotometría UV-Visible, se realizó la curva de calibración de Hg^{2+} por DRR planteándose para ello los experimentos presentados en la Tabla 25. Estos experimentos fueron realizados por triplicado y las lecturas se tomaron cada minuto por 10 minutos de reacción. Los resultados obtenidos se presentan en las Figuras 45, 46 y 47.

Tabla 25. Experimentos para obtener las curvas de calibración de Hg^{2+} por dispersión utilizando las AuNPs de 78 nm y una concentración de citrato de sodio 5 mM.

Experimento	Concentración de AuNPs (pM)	Concentración de Hg^{2+}	Concentración de lisina (mM)
1	1.88	0 nM	0.8
2	1.88	10 nM	0.8
3	1.88	25 nM	0.8
4	1.88	50 nM	0.8
5	1.88	75 nM	0.8
6	1.88	100 nM	0.8
7	1.88	250 nM	0.8
8	1.88	1 μM	0.8
9	1.88	2 μM	0.8

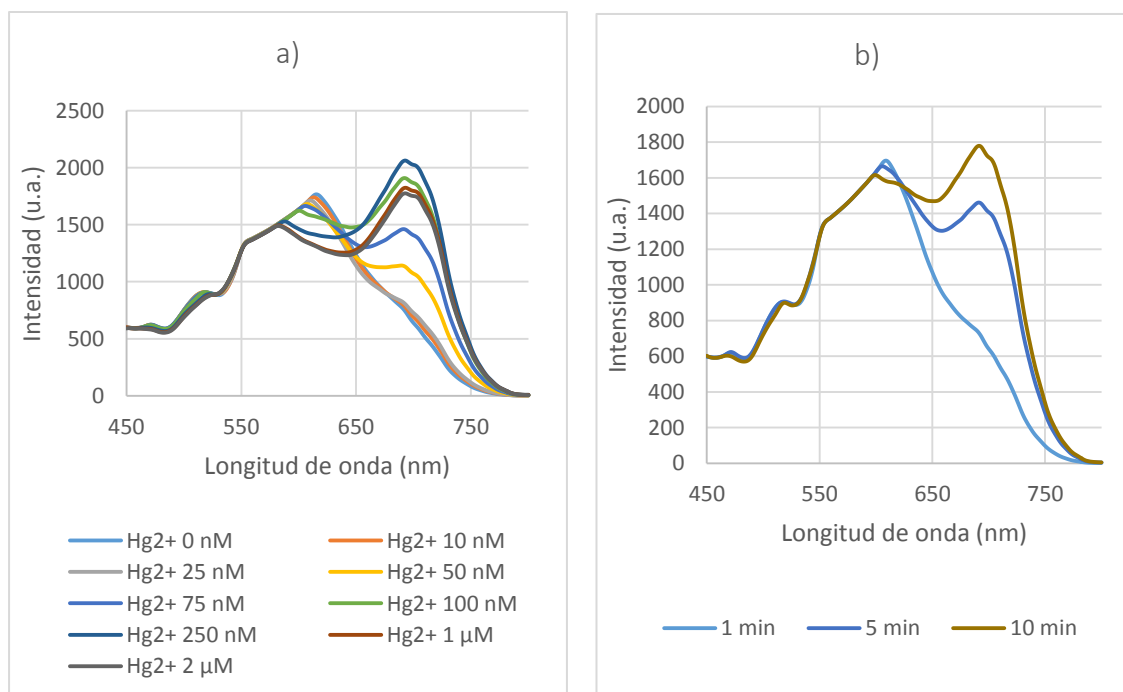


Figura 45. Espectros de dispersión para diferentes concentraciones de Hg^{2+} utilizando AuNPs de 78 nm y el protocolo propuesto optimizado. a) Espectros de dispersión a los 5 minutos de reacción y b) variación en el tiempo del espectro de dispersión de las AuNPs en la detección de Hg^{2+} 75 nM.

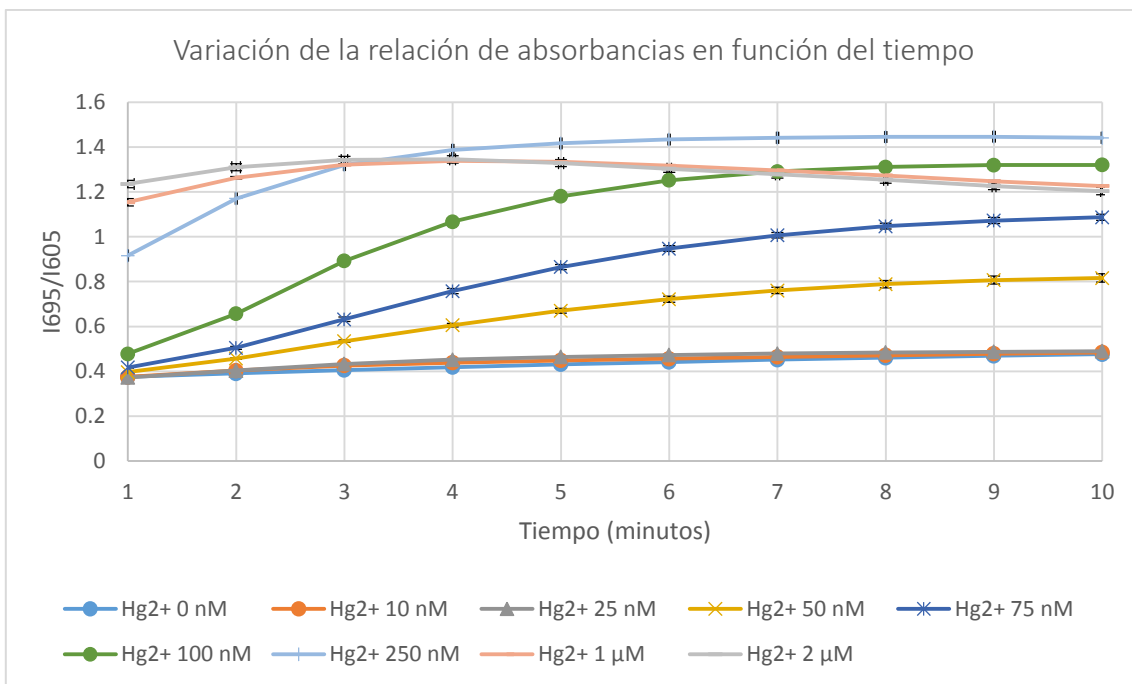


Figura 46. Relación de intensidades I_{695nm}/I_{605nm} en función del tiempo de los experimentos para diferentes concentraciones de Hg^{2+} utilizando AuNPs de 78 nm y el protocolo propuesto optimizado. Las barras de error representan \pm el error estándar de la media.

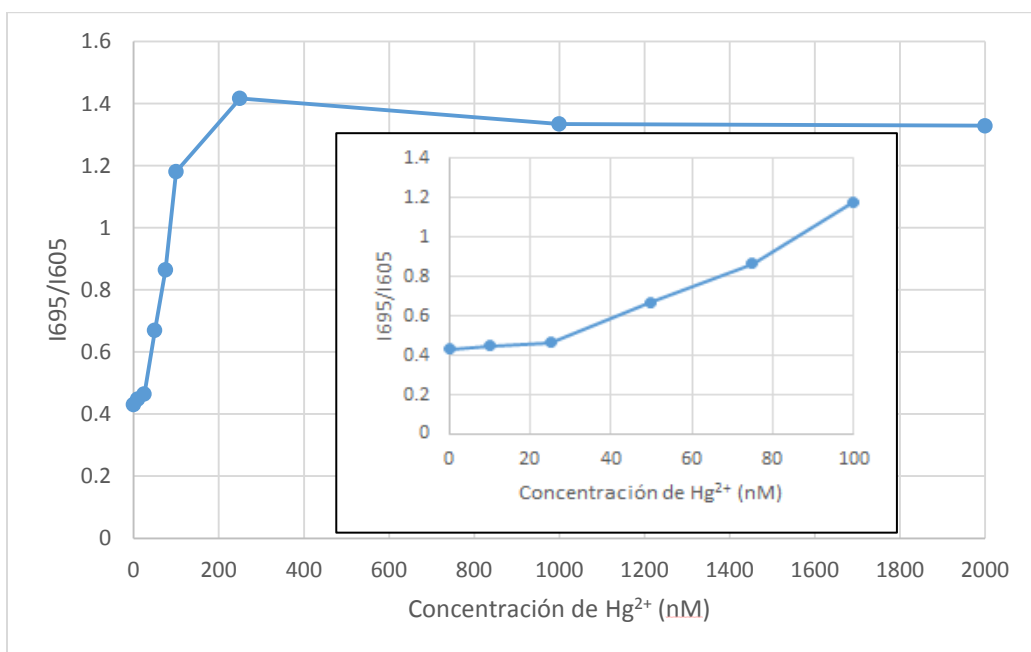


Figura 47. Curva de calibración de Hg^{2+} por DRR a los 5 minutos de reacción utilizando AuNPs de 78 nm y el protocolo propuesto optimizado. El *inset* muestra la respuesta lineal del ensayo a bajas concentraciones de Hg^{2+} . Las barras de error representan \pm el error estándar de la media.

Los resultados para este tamaño de partícula permitieron detectar hasta 50 nM de Hg^{2+} mediante DRR.

5.3.5 Estudio de detección de Hg^{2+} en presencia de interferentes

Dados los buenos resultados que se obtuvieron en la detección de cantidades bajas de Hg^{2+} con los distintos tamaños de AuNPs, se procedió a realizar los estudios de detección de Hg^{2+} en presencia de interferentes. Los interferentes elegidos para llevar a cabo los experimentos se seleccionaron en base a los cationes y aniones que pudieran estar presentes en muestras reales de agua potable [66].

Teniendo en cuenta que los tres tamaños de AuNPs permitieron detectar concentraciones menores a 50 nM de Hg^{2+} , se eligió para los estudios de interferencia a las AuNPs de 42 nm realizándose la detección de Hg^{2+} por dispersión a los cinco minutos de interacción (ver Discusión de resultados, sección 6.2.7). Se realizó el estudio de interferentes analizando cómo afecta la presencia de estas especies al espectro UV-Visible, tanto en ausencia como en presencia de Hg^{2+} 75 nM. La concentración utilizada de interferentes fue de 50 μM con excepción de las sales de calcio y magnesio cuya concentración fue de 250 μM dado que los límites máximos permisibles para la dureza del agua de grifo en Lima es cercana a ese valor [66]. La lista de sales utilizadas en los estudios de interferencia se presenta en la Tabla 26. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 48.

Tabla 26. Sales utilizadas en el estudio de influencia de interferentes en la detección de Hg^{2+} .

NaNO_2	MgCl_2	NaNO_3	Na_2SO_4
FeCl_3	SrCl_2	FeSO_4	NaF
NaHCO_3	Na_2CO_3	KCl	Na_2HPO_4
CaCl_2	-	-	-

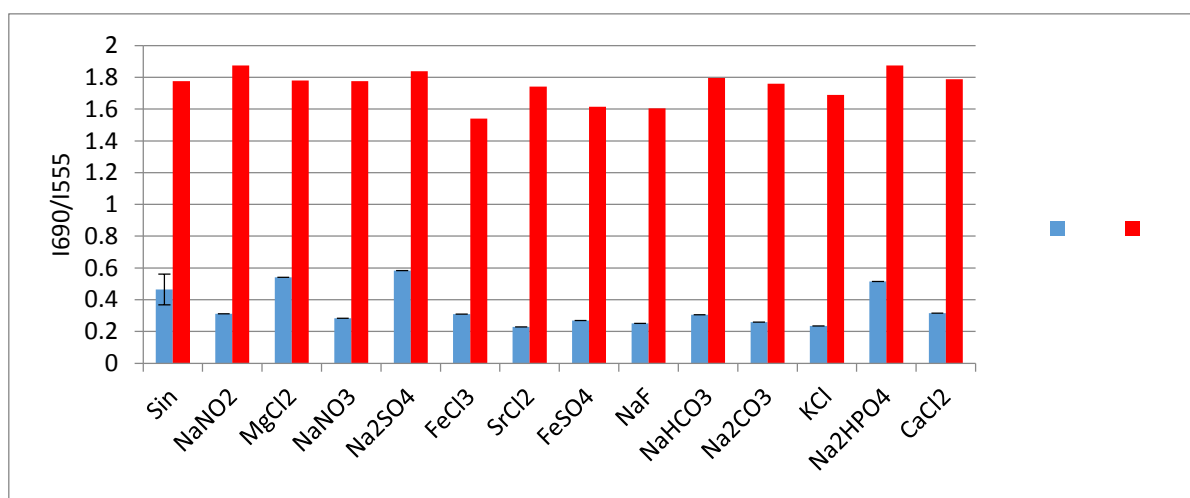


Figura 48. Efecto de los posibles interferentes en el método de detección en ausencia y en presencia de Hg^{2+} . Se empleó 50 μM de interferente, con excepción de las sales de calcio y magnesio cuya concentración fue de 250 μM .

Finalmente, se procedió a realizar un experimento para detectar Hg^{2+} en el cual se analizó agua potable obtenida del laboratorio de Análisis Instrumental de la Sección de Química de la Pontificia Universidad Católica del Perú (Figura 49) a la cual se le añadió Hg^{2+} 75 nM y se le comparó con una muestra de agua Milli-Q con la misma cantidad de Hg^{2+} .

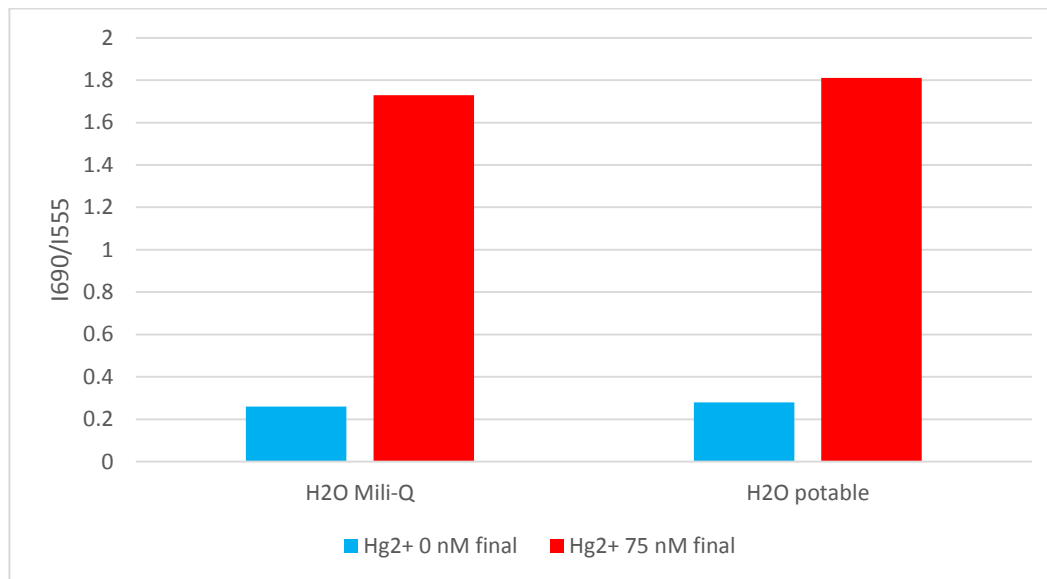


Figura 49. Comparación de detección de Hg^{2+} en agua Milli-Q y en agua de caño de la Pontificia Universidad Católica del Perú.

Como se observa, la señal del sensor en agua Milli-Q y en agua potable son muy cercanas. Por tanto, se puede concluir que los interferentes presentes en dicha matriz no dificultan la aplicabilidad del sensor en el análisis de muestras reales. Adicionalmente, se observa que hay diferencia entre la señal obtenida en este ensayo en presencia de Hg^{2+} con la reportada en la curva de calibración para las AuNPs de 42 nm. Esto se debe a que los experimentos aquí descritos se realizaron un mes después de realizada la curva de calibración. Aunque los demás reactivos se preparan frescos el día de los experimentos, el lote de AuNPs empleado estuvo almacenado durante ese tiempo y por tanto puede haber sufrido cambios que afecten la respuesta del sensor.

6 Discusiones de resultados

6.1 Síntesis de AuNPs de diferente tamaño

Dado los objetivos planteados, este trabajo se basó en dos etapas principales: la síntesis de AuNPs y la detección de Hg^{2+} . Inicialmente, se buscó obtener AuNPs de tres diámetros distintos para evaluar el efecto del tamaño de partícula en la detección de Hg^{2+} . Para este fin, se utilizaron rutas de síntesis apropiadas. La síntesis de AuNPs involucra el uso de la sal de HAuCl_4 y el reductor citrato de sodio (Cit) siendo las condiciones de reacción tales como la temperatura y la proporción Au:Cit las que definen el tamaño así como la polidispersidad del producto obtenido.

En lo que se refiere a la síntesis de las AuNPs de 14 nm la proporción Au:Cit es la que define el tamaño teniendo la temperatura a su vez un rol muy importante puesto que esta síntesis debe ser llevada a cabo a ebullición.

Por otro lado, en lo que se refiere a la síntesis de AuNPs de diferentes tamaños por el proceso de nucleación y crecimiento, se siguió el método propuesto por Bastús y col. [41] reduciéndose los volúmenes de todos los reactivos utilizados en la síntesis a la tercera parte pero manteniendo las concentraciones especificadas en el protocolo de síntesis. Adicionalmente, se realizó una modificación en la metodología propuesta por Bastús y col. [41] en el proceso de extracción de AuNPs al terminar cada generación la cual consistió en reducir la cantidad de AuNPs que se dejaban de una generación a otra para recrecer. En otras palabras de los 50 mL de AuNPs que se obtienen en la primera síntesis de AuNPs se dejó en el balón de reacción 18.3 mL de las AuNPs y los restantes 32.7 mL se almacenaron, a diferencia de lo especificado en el protocolo de Bastús y col. en el cual se debería extraer 18.3 mL de las AuNPs y los restantes 32.7 mL se deberían seguir usando en el proceso de nucleación y crecimiento.

La modificación realizada en el protocolo permitió obtener los tamaños deseados de AuNPs en menos etapas, obteniéndose el tamaño más grande de AuNPs buscado en la cuarta generación, mientras que con el procedimiento original dicho tamaño se obtenía en la novena generación.

El porqué de la diferencia de los tamaños de las AuNPs en las generaciones obtenidas al variar el protocolo de síntesis podría explicarse en base a la cantidad de AuNPs que se utiliza para llevar a cabo la obtención de las nuevas generaciones ya que tanto las adiciones posteriores de las sales de oro y citrato de sodio así como los tiempos de reacción se han mantenido acorde a lo especificado por Bastús y col. En el protocolo utilizado, al haber una menor cantidad de AuNPs en el balón de reacción, habrá un mayor número de átomos que se depositarán por núcleo de AuNPs existentes de la generación correspondiente dando lugar a AuNPs de mayor tamaño que las que se obtendría si hubiese mayor cantidad de AuNPs, en las cuales los átomos se dispersarían en una mayor cantidad de núcleos existentes y el aumento de tamaño será de menor magnitud (Figura 50).

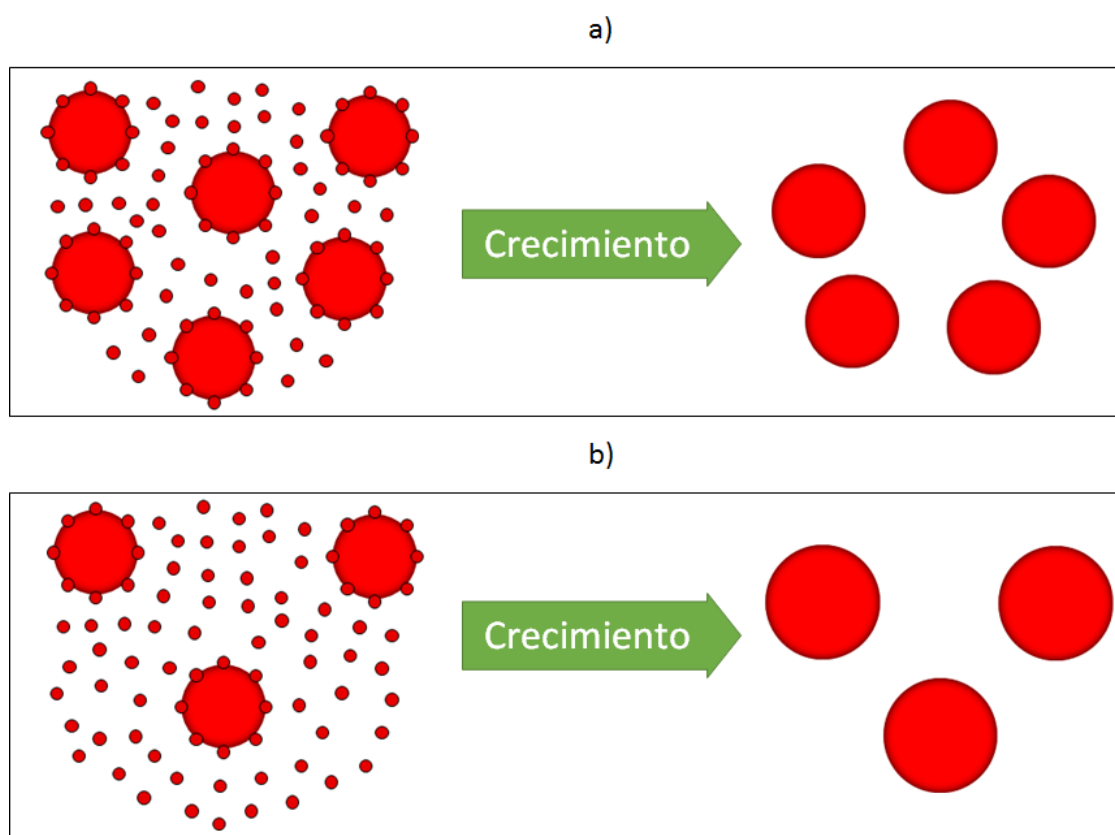


Figura 50. Proceso de crecimiento de nanopartículas. a) Hay una mayor cantidad de AuNPs sobre la cual recrecer y b) hay una menor cantidad de AuNPs sobre la cual recrecer. Los puntos pequeños representan átomos de oro.

6.2 Estudios de detección de Hg^{2+} con AuNPs de diferente tamaño

El uso de AuNPs para detectar Hg^{2+} en medio acuoso involucró una serie de etapas de análisis para determinar las condiciones óptimas del ensayo utilizado. Los experimentos realizados en la sección 5.3 permitieron corroborar que son varias las variables que afectan la detección de Hg^{2+} en medio acuoso utilizando AuNPs.

Como se mencionó en la sección 5.2.3, el ensayo utilizando AuNPs y lisina para la detección de Hg^{2+} en sistemas acuosos está basado en el ensayo de Sener y col. el cual utiliza un tamaño de partícula de 24 nm obtenido mediante una síntesis basada en el método de Turkevich-Frens. El estudio de detección con las AuNPs de 14 nm sentó las bases para la optimización de la metodología y las condiciones experimentales propicias para detectar concentraciones bajas de Hg^{2+} .

6.2.1 Efecto de la concentración de AuNPs

Los resultados obtenidos al variar la concentración de AuNPs mostraron que al disminuir la concentración de AuNPs, en cualquiera de los tamaños utilizados se podía detectar de una manera más eficiente concentraciones bajas de Hg^{2+} . Esto se puede explicar teniendo en cuenta la cantidad de Hg^{2+} y la distribución de este en las AuNPs. Debemos tener en cuenta que el mecanismo de reacción consiste en que el Hg^{2+} en solución se reduce en la superficie de las AuNPs gracias al citrato de sodio que recubre las AuNPs [65]. Cuando se disminuye la concentración de AuNPs, disminuye el número de partículas por volumen de la solución y por tanto, se reduce el área donde se pueda reducirse el Hg^{2+} , que se depositará en mayor cantidad por cada AuNP, lo que favorecerá la detección como se puede apreciar en la Figura 51.

Cuando hay una mayor cantidad de Hg reducido por AuNP resulta más fácil que la lisina pueda enlazar de una manera más eficiente las AuNPs formando los agregados que causan el cambio de la LSPR. Esto explicaría la tendencia observada según la cual el límite de detección mejora mientras menor sea la concentración de AuNPs.

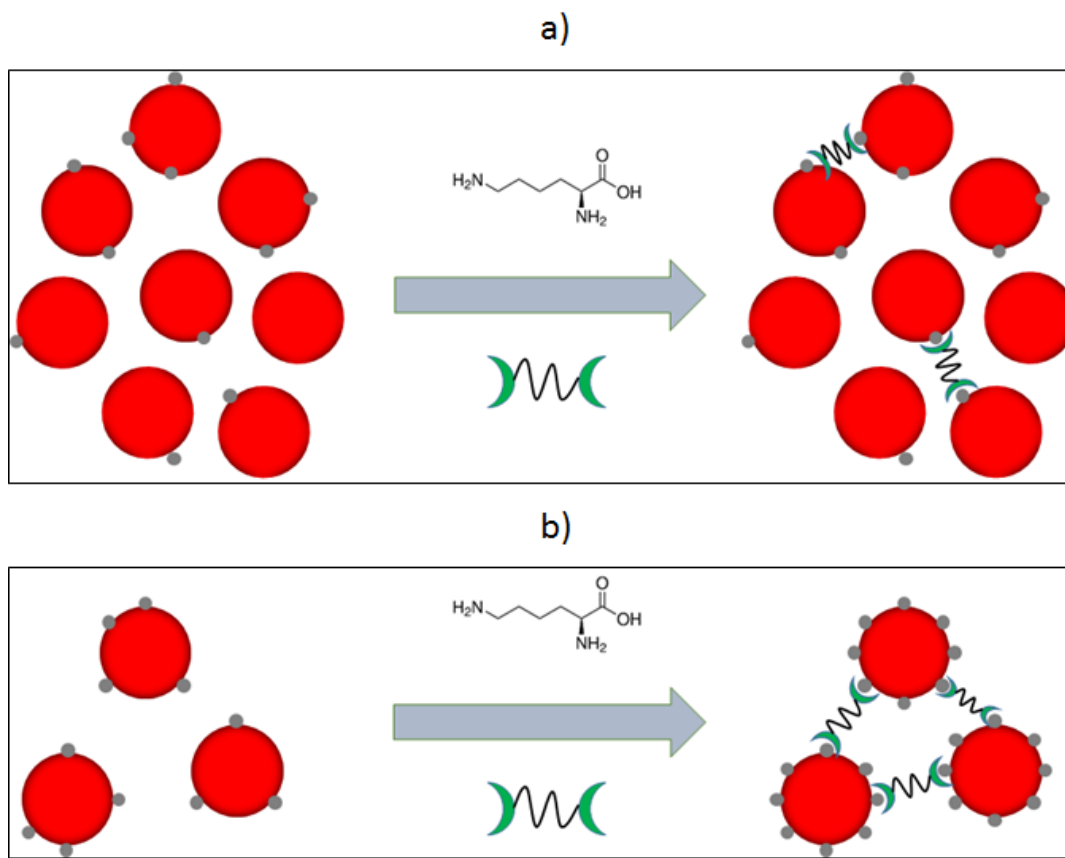


Figura 51. Representación de la repartición de una misma cantidad Hg^{2+} en las AuNPs al reducirse en su superficie cuando se utilizan a) altas concentraciones de AuNPs y b) bajas concentraciones de AuNPs.

6.2.2 Efecto del tiempo AuNPs – Hg

Ojea y col. han reportado que las AuNPs funcionalizadas con citrato de sodio son capaces de remover Hg^{2+} por acumulación de este en su superficie, sin embargo; la acumulación de Hg^{2+} provoca alteraciones en las AuNPs desestabilizándolas lo que da lugar a la agregación de éstas con forme aumenta el tiempo de contacto AuNPs - Hg [65].

Los mecanismos que se han reportado mediante los cuales se produce la interacción de Hg^{2+} con las AuNPs son dos: (i) el primero, en el cual se produce un recubrimiento superficial de las AuNPs por una capa de mercurio (quimisorción) y (ii) un proceso de amalgamación entre las AuNPs y Hg, que ocurre en diferente medida dependiendo del tiempo de reacción, la relación Au/Hg, y el área superficial disponible de las AuNPs, dando lugar a la aleación Au_3Hg . Adicionalmente, la adsorción de mercurio en la superficie de las AuNPs es un proceso rápido, mientras que la difusión del metal al interior es lenta. Pese a esto último, la unión de AuNPs amalgamadas causa una reducción drástica de la superficie disponible de estas e impide la adsorción de más mercurio [65]. La Figura 52 muestra un esquema de lo propuesto en dicha investigación

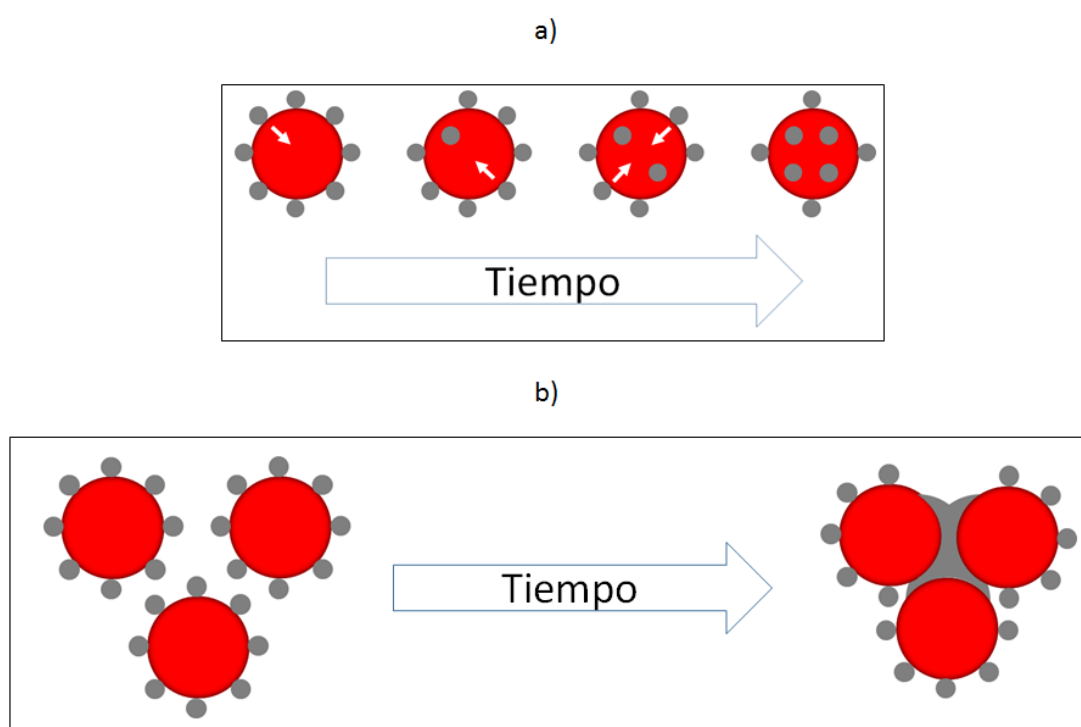


Figura 52. Interacción de las AuNPs con el mercurio reducido sobre su superficie. a) Difusión del mercurio al interior de las AuNPs y b) disminución del área superficial disponible de las AuNPs amalgamadas debido a la unión de estas.

La mejora de la señal del sensor con la disminución del tiempo de contacto observada en este trabajo, podría deberse al fenómeno de difusión de los átomos de Hg al interior de las AuNPs. No se ha observado evidencia de agregación de AuNPs en ausencia de lisina por lo que el mecanismo de amalgamación y posterior agregación de nanopartículas sería improbable.

6.2.3 Efecto de la concentración de lisina

Con respecto a los resultados obtenidos al variar la concentración de lisina, hay que tener en cuenta que la optimización de parámetros realizada en este trabajo no sólo se limita a las cantidades adecuadas de reactivos para la detección de Hg^{2+} , sino también a disminuir en lo posible las cantidades de reactivos utilizados en el proceso de detección. Es así que según los resultados obtenidos en la Figura 18, la concentración de lisina para llevar a cabo la detección de Hg^{2+} se fijó en 0.8 mM. El cómo afecta la cantidad de lisina a la detección de Hg^{2+} se puede entender en base a que la lisina actúa como el puente que une las AuNPs que contienen mercurio en su superficie. Al disminuir la cantidad de lisina en la detección de Hg^{2+} se disminuye la cantidad de aglomerados que se producirán al formarse el enlace Lis – AuNPs recubiertas con Hg tal como se muestra en la Figura 53.

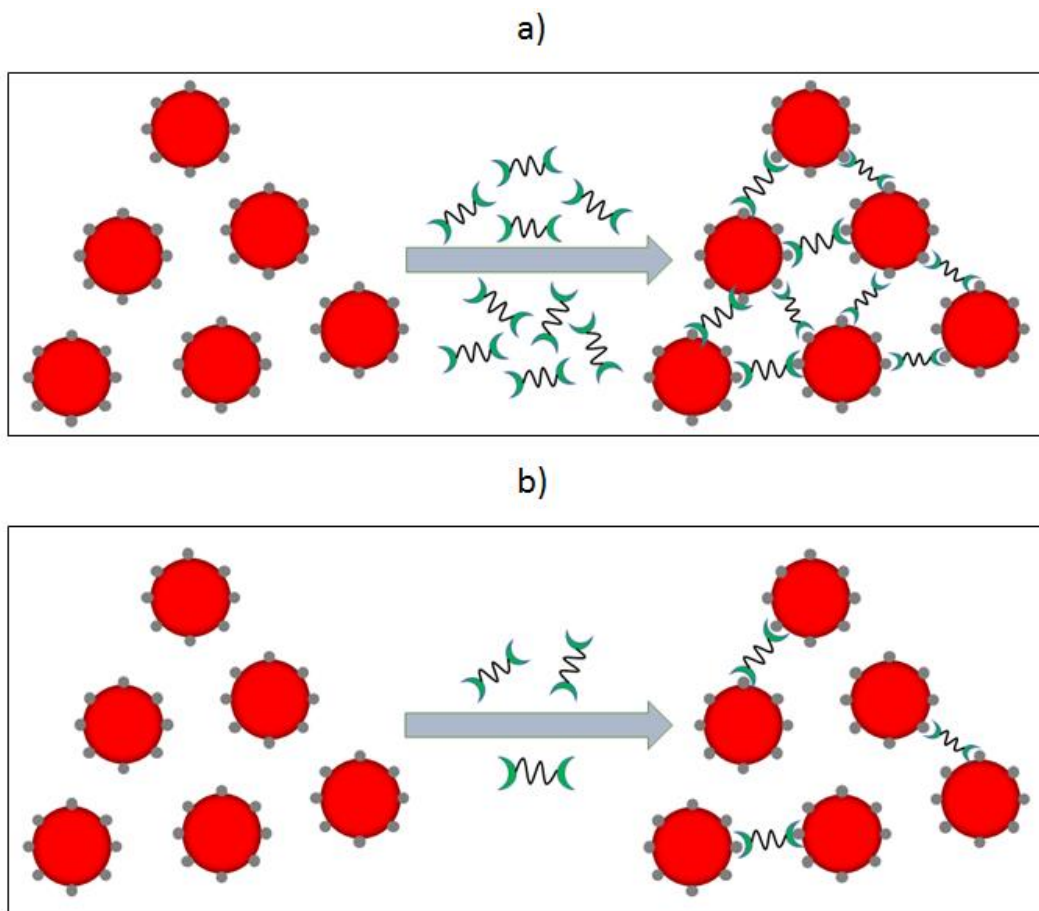


Figura 53. Efecto de la cantidad de lisina utilizada en la detección de Hg^{2+} en donde se muestra una misma cantidad de AuNPs recubiertas con Hg^{2+} adicionándole a) una alta concentración de lisina y b) una baja concentración de lisina.

Por lo mencionado anteriormente se eligió una concentración 0.8 mM de lisina ya que según los resultados obtenidos una menor concentración de ésta disminuía la señal obtenida a un mismo tiempo de contacto que la concentración seleccionada y, por otro lado, si se aumentaba la cantidad de lisina no se producían diferencias en la señal al compararla con la concentración seleccionada, indicando que se tiene un exceso de lisina en la mezcla. Adicionalmente, dado que la detección utilizando lisina está relacionada con la cantidad de Hg^{2+} a detectar y siendo las cantidades a detectar, en los experimentos llevados a cabo, bastante bajas se optó por mantener la concentración de lisina constante en todos los análisis de detección con los diferentes tamaños de AuNPs.

6.2.4 Efecto de la adición de citrato de sodio

Como se mencionó anteriormente, las AuNPs necesitan de la presencia de citrato de sodio para poder llevar a cabo la detección de Hg^{2+} según lo reportado por Sener y col., ya que es éste el encargado de reducir el Hg^{2+} a Hg que, posteriormente, se deposita en la superficie de las AuNPs. Sin embargo, el citrato únicamente es capaz de reducir al Hg^{2+} en solución en presencia de las AuNPs ya que son estas las que catalizan dicha reacción [7,65].

Adicionalmente, se debe tener en cuenta que en el reporte del sensor original [7], las AuNPs utilizadas se sintetizaron utilizando una concentración de citrato de sodio que es casi 18 veces la concentración de HAuCl_4 , mientras que para la síntesis de las nanopartículas utilizadas en este trabajo la proporción de concentraciones de $\text{Na}_3\text{Cit}:\text{HAuCl}_4$ fue de aproximadamente 4:1 para obtener las AuNPs de 14 nm y de aproximadamente 5:1 para la síntesis de AuNPs más grandes. Es decir, debido a las condiciones definidas para obtener los tamaños deseados de AuNPs se aprecia que habrá una menor cantidad de citrato de sodio en el medio en el que las AuNPs están suspendidas en comparación con el trabajo de Sener y col. (Figura 54) [7,41].

Dado que los resultados obtenidos utilizando el protocolo propuesto (sección 5.2.3.2) mostraban que solo se llegaba a detectar Hg^{2+} en cantidades del orden de micromolar, se decidió analizar si adicionando citrato de sodio a la mezcla que contiene Hg^{2+} en solución sería posible detectar concentraciones menores en base la hipótesis planteada de que la relación $\text{Na}_3\text{Cit}:\text{HAuCl}_4$ tenía un rol importante en la detección de Hg^{2+} . Tal como se muestra en la sección de resultados, la presencia de citrato de sodio favoreció la detección de cantidades más bajas de Hg^{2+} corroborando la hipótesis planteada.

Pese a los buenos resultados obtenidos adicionando citrato de sodio a la mezcla, se debe tener en cuenta que la cantidad que se puede añadir de éste a la mezcla debe estar limitada, puesto que la estabilidad de las AuNPs depende de la fuerza iónica a la cual se encuentran sometidas. Es decir, si en el medio en el que se encuentran las AuNPs se adiciona cada vez una mayor cantidad de citrato de sodio, la desestabilización se produce con mayor rapidez que a concentraciones más bajas debido a que el aumento de citrato de sodio favorece el aumento de la fuerza iónica de la mezcla y el aumento de la fuerza iónica produce la desestabilización de las AuNPs por el efecto que causa en la doble capa eléctrica de estas [56]. Adicionalmente, el tiempo de contacto del citrato de sodio y las AuNPs tiene un rol fundamental en la detección de Hg^{2+} ya que a mayor tiempo de contacto entre ellos, se produce una desestabilización de las AuNPs tal y como muestran los resultados de los blancos de detección para los diferentes tamaños de AuNPs en los que se utilizó citrato de sodio en la metodología.

Los resultados obtenidos también mostraron que hay una relación entre la cantidad de citrato de sodio que se podía adicionar sin que se produzca la agregación de las AuNPs y el tamaño de las AuNPs, siendo ésta que, a mayor tamaño de AuNPs se podía adicionar menor cantidad de citrato de sodio. Lo mencionado antes se puede explicar teniendo en cuenta la relación de $\text{Na}_3\text{Cit}:\text{HAuCl}_4$ utilizada para obtener las AuNPs siendo mayor esta relación conforme se obtenían las AuNPs de mayor tamaño. Es decir, conforme aumentaba el tamaño de las AuNPs había una mayor fuerza iónica en el medio en que se encontraban estas.

También se puede mencionar como otro factor que explique la relación obtenida el hecho de que, al aumentar el tamaño de las AuNPs la estabilidad de éstas puede verse afectada de una manera más apreciable ya que las nanopartículas de mayor tamaño son menos estables que las más pequeñas, debido a la mayor fuerza de atracción ejercida por las fuerzas de Van Der Waals que está ligada al tamaño de estas la cual disminuye la energía total de interacción haciéndolas menos estables y más propensas a fenómenos y procesos de coagulación, por lo que son más sensibles a las alteraciones en el ambiente químico de éstas, las cuales podrían dar lugar a su inminente agregación [56].

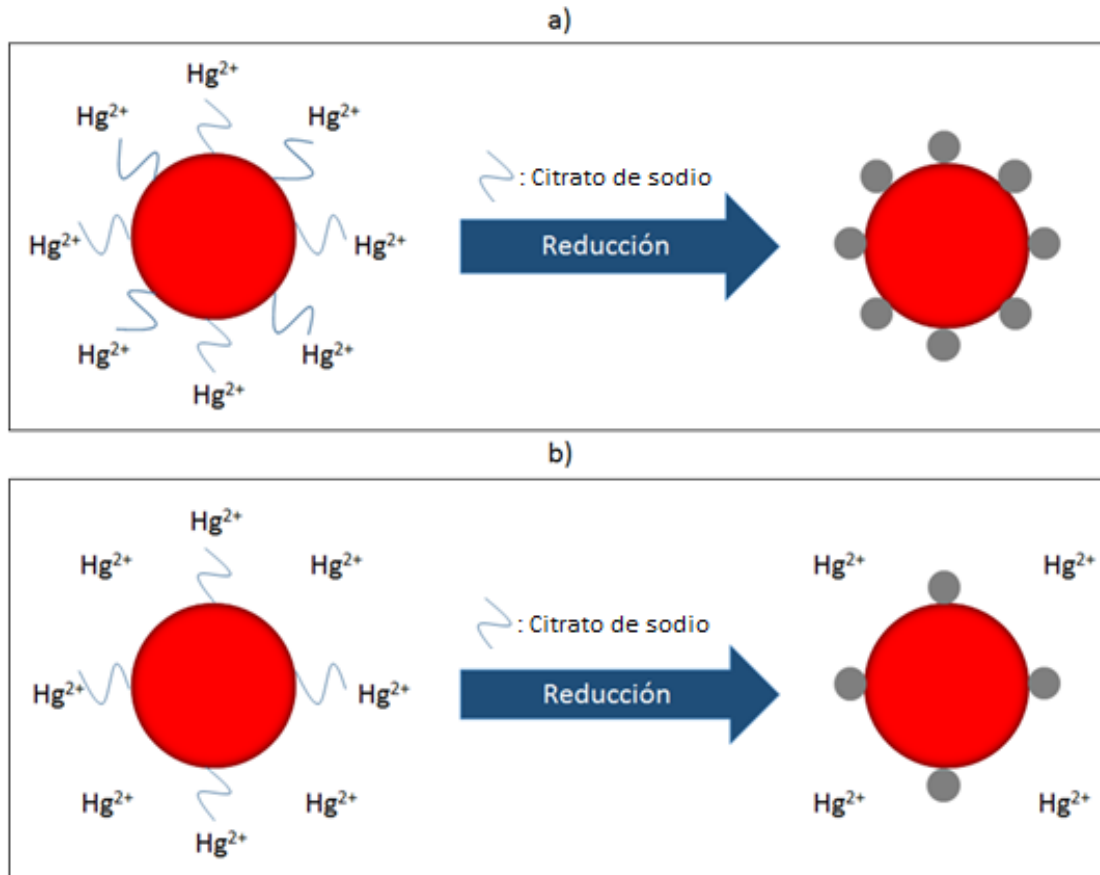


Figura 54. Reducción de Hg^{2+} en la superficie de las AuNPs por acción del citrato de sodio cuando a) hay una cantidad adecuada de citrato de sodio en el medio para reducir el Hg^{2+} y cuando b) hay deficiencia de citrato de sodio en el medio y no se reduce todo el Hg^{2+} .

6.2.5 Efecto del tamaño de partícula

Para el estudio del efecto del tamaño de partícula se debe tener en cuenta que para cada tamaño de AuNPs estudiada en la detección de Hg^{2+} se ha realizado una optimización de los parámetros involucrados. Esta optimización ha resultado ser diferente para cada uno de los tamaños de AuNPs debido a las condiciones de síntesis que involucraron la obtención de los tres tamaños de AuNPs. Adicionalmente, se ha de apreciar que los tamaños de partícula tienen una gran influencia en lo que se refiere a la ubicación del pico del plasmón superficial de resonancia y el pico correspondiente a la formación de agregados al iniciarse la detección de Hg^{2+} (entre otras propiedades). Esto se resume en el hecho de que para cada tamaño de partícula se realizó una selección de la relación de longitudes de onda a la cual se podría apreciar una mayor señal. Esta selección se realizó tanto en los estudios de absorción como de dispersión de luz. Adicionalmente se puede mencionar que la variación del tamaño tiene un efecto en lo que es la sensibilidad de la señal de detección lo cual se discutirá con más detalle en la siguiente sección.

6.2.6 Curvas de calibración de Hg^{2+}

Las curvas de calibración de Hg^{2+} obtenidas tanto por espectrofotometría UV-Visible como por DRR son los resultados más resaltantes de este trabajo. A partir de las curvas de calibración obtenidas se puede apreciar la capacidad del ensayo para detectar distintas concentraciones de Hg^{2+} . Además con ayuda de las curvas de calibración es posible apreciar la influencia que tiene el tamaño de partícula en la detección de Hg^{2+} . La Tabla 27 resume los resultados obtenidos en las curvas de calibración de Hg^{2+} para los diferentes tamaños de AuNPs.

A partir de los resultados de la Tabla 27 se puede destacar que de los tres tamaños de AuNPs, las de 42 nm brindaron la mejor detección de Hg^{2+} dando el rango más amplio de detección por dispersión de luz.

Las AuNPs de 78 nm permitieron detectar concentraciones bajas de Hg^{2+} por absorción, pero, en los resultados por dispersión la cantidad mínima detectada fue de 50 nM. Este resultado obtenido podría deberse a que por ser las AuNPs más grandes que en los otros dos casos su inestabilidad es mucho mayor en el medio en el que se encuentran, siendo mucho más apreciable esta inestabilidad en los estudios por dispersión dificultando la distinción entre cantidades bajas de Hg^{2+} y el blanco de detección. Adicionalmente el rango de detección que abarcó este tamaño de partícula resultó ser el más corto por medidas de absorción, lo cual limita la aplicabilidad del sensor.

En lo que corresponde a la detección con las AuNPs de 14 nm se observó que la detección debe llevarse a cabo por un tiempo mayor a los 5 minutos requeridos para las AuNPs de 42 y 78 nm. Dichos tiempos se determinaron buscando que la respuesta obtenida brindase una mejor sensibilidad. Para este tamaño de AuNPs la detección por dispersión resultó ser menos sensible que para la detección por espectrofotometría UV-Visible. Esto puede explicarse en base a que las AuNPs de 14 nm al ser tan pequeñas no dispersan la luz ocasionando que la señal obtenida sea prácticamente de muy baja sensibilidad [33].

Las AuNPs de 42 nm exhibieron los mejores resultados en lo que se refieren a la detección de Hg^{2+} dado que los resultados obtenidos tanto por espectrofotometría UV-Visible como por dispersión mostraron curvas de calibración con una alta sensibilidad a bajos tiempos de ensayo (5 minutos). Los resultados obtenidos también muestran que la detección por DRR resulta ser más sensible que la obtenida mediante espectrofotometría UV-Visible. El hecho de que los resultados por DRR hayan sido mejores para este tamaño de AuNPs con respecto a los otros utilizados se le puede atribuir a que las AuNPs de 42 nm son capaces de dispersar la luz con más intensidad que las de 14 nm y por otro lado, las AuNPs de 42 nm al ser más estables que las de 78 nm podrán detectar mayores cantidades de Hg^{2+} sin aglomerar tan rápido en el proceso de detección como lo harían las AuNPs más grandes [33].

Tabla 27. Comparación de los resultados obtenidos aplicando las dos técnicas de detección de Hg^{2+} y utilizando los tres tamaños de AuNPs.

Técnica Tamaño de AuNPs	Espectrofotometría UV-Visible	Dispersión Rayleigh de Resonancia
14 nm	Es posible detectar concentraciones de hasta 10 nM de Hg^{2+} . El rango de respuesta es 0.1 – 1.3 abarcando concentraciones de 0 a 200 nM. El tiempo de respuesta del sensor fue de 15 minutos.	Es posible detectar concentraciones de hasta 10 nM de Hg^{2+} . El rango de respuesta es 0.7 - 1.9 abarcando concentraciones de 0 a 250 nM. El tiempo de respuesta del sensor fue de 10 minutos.
42 nm	Es posible detectar concentraciones de hasta 25 nM de Hg^{2+} . El rango de respuesta es de 0.1 – 1.0 abarcando concentraciones de 25 a 100 nM. El tiempo de respuesta del sensor fue de 5 minutos.	Es posible detectar concentraciones de hasta 10 nM de Hg^{2+} . El rango de respuesta es de 0.5 – 1.7 abarcando concentraciones de 0 a 100 nM. El tiempo de respuesta del sensor fue de 5 minutos.
78 nm	Es posible detectar concentraciones de hasta 10 nM de Hg^{2+} . El rango de respuesta es de 0.1 – 0.6 abarcando concentraciones de 0 a 100 nM. El tiempo de respuesta del sensor fue de 5 minutos.	Es posible detectar concentraciones de hasta 50 nM de Hg^{2+} . El rango de respuesta es de 0.4 – 1.2 abarcando concentraciones de 50 a 100 nM. El tiempo de respuesta del sensor fue de 5 minutos.

Por lo tanto, es posible detectar hasta 10 nM de Hg^{2+} aplicando la metodología establecida y realizando el análisis de detección por DRR con AuNPs de 14 y 42 nm. Se eligió el sensor con nanopartículas de 42 nm para los estudios de interferencias y para las investigaciones futuras debido a que estas AuNPs proveen una mucha mayor intensidad de luz dispersada. De hecho, bajo las condiciones experimentales empleadas en este trabajo, la intensidad de luz dispersada por las AuNPs de 42 nm es 8 veces superior a las de 14 nm. Esto representa una ventaja significativa en cuanto a la relación señal/ruido del sensor, especialmente si se desea mejorar el límite de detección disminuyendo la concentración de AuNPs [33].

6.2.7 Estudio de interferencias

Las sales utilizadas en el análisis de interferentes así como las concentraciones que se han utilizado están basadas en las cantidades que se puede encontrar de estos iones en una muestra de agua potable de la ciudad de Lima [66]. Tal como se muestra en la sección 5.3.5, se ha determinado que las sales utilizadas en el estudio no afectan prácticamente a la detección de Hg^{2+} . Este resultado obtenido es muy favorable para el propósito de este trabajo dado que el sensor diseñado estaría habilitado para cuantificar Hg^{2+} en una matriz de agua potable de Lima.

Dado los buenos resultados obtenidos en los estudios de interferencias se esperaba que se podría detectar sin problemas una cantidad conocida de Hg^{2+} que se adicione a una muestra real, por tal motivo se procedió a aplicar el ensayo a una muestra de agua potable tomada de la Pontificia Universidad Católica del Perú. La gráfica comparativa mostrada en la Figura 49 de la sección 5.3.5 resalta que la muestra de agua potable y la de agua Milli-Q presentan señales similares cuando no se ha adicionado Hg^{2+} en el ensayo, mostrando que no hay un efecto importante por parte de los interferentes en la señal del sensor.

Adicionalmente, cuando se contaminan ambas muestras de H_2O con Hg^{2+} 75 nM, la señal de las respuestas obtenidas resultaron ser bastante cercanas. Es decir, el sensor diseñado fue capaz de determinar Hg^{2+} en una matriz de agua más compleja manteniendo la señal de respuesta prácticamente igual que en la muestra que no contenía interferentes.

7 Conclusiones y recomendaciones

7.1 Conclusiones

- Se sintetizaron AuNPs de diferente tamaño aplicando metodologías basadas en procesos de nucleación y crecimiento obteniéndose AuNPs de aproximadamente 14, 42 y 78 nm de diámetro, las cuales se caracterizaron por espectrofotometría UV-Visible.
- Los ensayos propuestos optimizados permitieron detectar concentraciones de Hg^{2+} de hasta 10, 25 y 10 nM para los ensayos de absorción con AuNPs de 14, 42 y 78 nm, respectivamente; y hasta 10, 10 y 50 nM para los ensayos de dispersión con AuNPs de 14, 42 y 78 nm, respectivamente, con tiempo de detección de entre 5-15 min.
- Las condiciones establecidas en los estudios por espectrofotometría UV-Visible fueron adaptadas a los análisis por dispersión de luz mostrando muy buenos resultados en la detección de cantidades bajas de Hg^{2+} llegándose a determinar que las AuNPs de 42 nm brindaban la mejor respuesta y una mejor sensibilidad siendo la menor cantidad detectada 10 nM de Hg^{2+} y el tiempo de respuesta del sensor de cinco minutos.

- Se aplicó exitosamente el sensor DRR con AuNPs de 42 nm en la cuantificación de Hg^{2+} en una matriz de agua potable (contaminada artificialmente con Hg^{2+}). La respuesta obtenida fue similar a la obtenida en una matriz de agua Milli-Q sin interferentes, lo que muestra la aplicabilidad de este sensor a matrices reales similares a la analizada.

7.2 Recomendaciones

- Se recomienda realizar estudios de reproducibilidad en el tiempo de la detección de Hg^{2+} con los diferentes tamaños de AuNPs con la finalidad de analizar si hay variaciones apreciables en la señal de la detección entre distintos lotes de AuNPs.
- Se recomienda realizar un estudio de la respuesta del sensor en función al tiempo de envejecimiento de las AuNPs ya que al pasar el tiempo puede producirse alteraciones en el coloide que podrían generar cambios apreciables en la señal obtenida.
- Se espera que el límite de detección mejore disminuyendo la concentración de AuNPs en el ensayo. Se recomienda efectuar dichos experimentos con las AuNPs de mayor tamaño, por proveer una señal de dispersión mucho más intensa que las pequeñas.
- Sería conveniente realizar más estudios de detección con matrices de agua potable de diferentes fuentes para ver las posibles limitaciones en la detección de Hg^{2+} .

8 Referencias bibliográficas

1. Saha K, Agasti SS, Kim C, Li X, Rotello VM. Gold nanoparticles in chemical and biological sensing. *Chem Rev.* 2012;112(5):2739–79.
2. Kim Y-R, Mahajan RK, Kim JS, Kim H. Highly sensitive gold nanoparticle-based colorimetric sensing of mercury(II) through simple ligand exchange reaction in aqueous media. *Appl Mater interfaces.* 2010;2(1):292–5.
3. Chen M, Cai HH, Yang F, Lin D, Yang PH, Cai J. Highly sensitive detection of chromium (III) ions by resonance Rayleigh scattering enhanced by gold nanoparticles. *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc.* 2014;118:776–81.
4. Chen L, Chan L, Fu X, Lu W. Highly sensitive and selective colorimetric sensing of Hg^{2+} based on the morphology transition of silver nanoprisms. *Appl Mater Interfaces.* 2013;5(2):284–90.

5. Annadhasan M, Muthukumarasamyvel T, Sankar Babu VR, Rajendiran N. Green Synthesized Silver and Gold Nanoparticles for Colorimetric Detection of Hg^{2+} , Pb^{2+} , and Mn^{2+} in Aqueous Medium. *Sustain Chem Eng.* 2014;2(4):887–96.
6. Fu XB, Qu F, Li NB, Luo HQ. A label-free thrombin binding aptamer as a probe for highly sensitive and selective detection of lead(ii) ions by a resonance Rayleigh scattering method. *Analyst.* 2012;137(5):1097–9.
7. Sener G, Uzun L, Denizli A. Lysine-promoted colorimetric response of gold nanoparticles: A simple assay for ultrasensitive mercury(II) detection. *Anal Chem.* 2014;86(1):514–20.
8. Morel FMM, Kraepiel AML, Amyot M. The Chemical Cycle and Bioaccumulation of Mercury. *Annu Rev Ecol Syst.* 1998;29(1):543–66.
9. Kozin LF, Hansen SC. *Mercury Handbook.* Cambridge: The Royal Society of Chemistry; 2013. pp 193-195.
10. Abdelhamid HN, Wu H-F. Ultrasensitive, rapid, and selective detection of mercury using graphene assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2014;25(5):861–8.
11. Liu D, Qu W, Chen W, Zhang W, Wang Z, Jiang X. Highly Sensitive, Colorimetric Detection of Mercury (II) in Aqueous Media by Quaternary Ammonium Group-Capped Gold Nanoparticles at Room Temperature. *Anal Chem.* 2010;82(23):9606–10.
12. Manahan SE. *Introducción a la química ambiental.* Barcelona: Editorial Reverté; 2007. pp 148-152.
13. EPA. United States Environmental Protection Agency [Internet]. Drinking Water Contaminants. 2014 [cited 2015 Nov 12]. Available from: <http://water.epa.gov/drink/contaminants/>
14. Leermakers M, Baeyens W, Quevauviller P, Horvat M. Mercury in environmental samples: Speciation, artifacts and validation. *Trends Anal Chem.* 2005;24(5):383–93.
15. Zamborini FP, Bao L, Dasari R. Nanoparticles in measurement science. *Anal Chem.* 2012;84(2):541–76.
16. Thibon A, Pierre VC. A Highly Selective Luminescent Sensor for the Time-Gated Detection of Potassium. *J Am Chem Soc.* 2009;131(2):434–5.

17. Zhang C, Suslick KS. A Colorimetric Sensor Array for Organics in Water. *J Am Chem Soc.* 2005;127(33):11548–9.
18. Nolan EM, Lippard SJ. A “Turn-On” Fluorescent Sensor for the Selective Detection of Mercuric Ion in Aqueous Media. *J Am Chem Soc.* 2003;125(47):14270–1.
19. Liu G, Wan Y, Gau V, Zhang J, Wang L, Song S, et al. An Enzyme-Based E-DNA Sensor for Sequence-Specific Detection of Femtomolar DNA Targets. *J Am Chem Soc.* 2008;130(21):6820–5.
20. Garimella PD, Meldrum T, Witus LS, Smith M, Bajaj VS, Wemmer DE, et al. Hyperpolarized Xenon-Based Molecular Sensors for Label-Free Detection of analytes. *J Am Chem Soc.* 2014;136(1):164–8.
21. Liu Y, Deng C, Tang L, Qin A, Hu R, Sun JZ, et al. Specific Detection of d-Glucose by a Tetraphenylethene-Based Fluorescent Sensor. *J Am Chem Soc.* 2011;133(4):660–3.
22. Xiao Y, Lou X, Uzawa T, Plakos KJI, Plaxco KW, Soh HT. An Electrochemical Sensor for Single Nucleotide Polymorphism Detection in Serum Based on a Triple-Stem DNA Probe. *J Am Chem Soc.* 2009;131(42):15311–6.
23. Radhakumary C, Sreenivasan K. Rapid and highly selective dipchecking for cyanide ions in aqueous media. *Analyst.* 2012;137(22):5387.
24. Lin H, Suslick KS. A Colorimetric Sensor Array for Detection of Triacetone Triperoxide Vapor. *J Am Chem Soc.* 2010;132(44):15519–21.
25. Lin H, Jang M, Suslick KS. Preoxidation for Colorimetric Sensor Array Detection of VOCs. *J Am Chem Soc.* 2011;133(42):16786–9.
26. Wen G, Liang A, Jiang Z. Functional Nucleic Acid Nanoparticle-Based Resonance Scattering Spectral Probe. *Plasmonics.* 2013;8(2):899–911.
27. Zhang Y, Chu W, Foroushani A, Wang H, Li D, Liu J, et al. New Gold Nanostructures for Sensor Applications: A Review. *Materials.* 2014;7(7):5169–201.
28. Aslan K, Lakowicz JR, Geddes CD. Nanogold Plasmon Resonance-Based Glucose absorption bands due to electron oscillations induced by. *Anal Chem.* 2005;77(7):2007–14.

29. Aslan K, Geddes CD. Wavelength-Ratiometric Plasmon Light Scattering-Based Immunoassays. *Plasmonics*. 2009;4(4):267–72.
30. Pasternack RF, Collings PJ. Resonance light scattering: a new technique for studying chromophore aggregation. *Science* (80-). 1995;269(5226):935–9.
31. Luo Y, He L, Zhan S, Wu Y, Liu L, Zhi W, et al. Ultrasensitive resonance scattering (RS) spectral detection for trace tetracycline in milk using aptamer-coated nanogold (ACNG) as a catalyst. *J Agric Food Chem*. 2014;62(5):1032–7.
32. Li Y, Jing C, Zhang L, Long Y-T. Resonance scattering particles as biological nanosensors in vitro and in vivo. *Chem Soc Rev*. 2012;41(2):632.
33. Jain PK, Lee KS, El-Sayed IH, El-Sayed M a. Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape, and composition: applications in biological imaging and biomedicine. *J Phys Chem B*. 2006;110(14):7238–48.
34. Dai XX, Li YF, He W, Long YF, Huang CZ. A dual-wavelength resonance light scattering ratiometry of biopolymer by its electrostatic interaction with surfactant. *Talanta*. 2006;70(3):578–83.
35. Chaudhary A, Dwivedi C, Chawla M, Gupta A, Nandi CK. Lysine and dithiothreitol promoted ultrasensitive optical and colorimetric detection of mercury using anisotropic gold nanoparticles. *J Mater Chem C*. 2015;3(27):6962–5.
36. Mingos DMP. *Gold clusters, colloids and nanoparticles*. Cham u.a.: Springer; 2014. 3-6 p.
37. Zhao P, Li N, Astruc D. State of the art in gold nanoparticle synthesis. *Coord Chem Rev*. 2013;257(3-4):638–65.
38. Schulz F, Homolka T, Bastús NG, Puntès VF, Weller H, Vossmeier T. Little Adjustments Significantly Improve the Turkevich Synthesis of Gold Nanoparticles. *Langmuir*. 2014;30(35):10779–84.
39. Guo H, Xue K, Yan L. Resonance Rayleigh scattering spectral method for determination of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine using gold nanoparticles as probe. *Sensors Actuators, B Chem*. 2012;171-172:1038–45.
40. Kimling J, Maier M, Okenve B, Kotaidis V, Ballot H, Plech A. Turkevich Method for Gold Nanoparticle Synthesis Revisited. *J Phys Chem B*. 2006;110(32):15700–7.

41. Bastús NG, Comenge J, Puentes V. Kinetically controlled seeded growth synthesis of citrate-stabilized gold nanoparticles of up to 200 nm: Size focusing versus ostwald ripening. *Langmuir*. 2011;27(17):11098–105.
42. Roll D, Malicka J, Gryczynski I, Gryczynski Z, Lakowicz JR. Metallic colloid wavelength-ratiometric scattering sensors. *Anal Chem*. 2003;75(14):3440–5.
43. Li C, Li D, Wan G, Xu J, Hou W. Facile synthesis of concentrated gold nanoparticles with low size-distribution in water: temperature and pH controls. *Nanoscale Res Lett*. 2011;6(1):440–50.
44. Link S, El-Sayed M a. Optical properties and ultrafast dynamics of metallic nanocrystals. *Annu Rev Phys Chem*. 2003;54:331–66.
45. Tozer J. Meet the Scientist: Dr. Richard Vaia [Internet]. Armed with Science. 2014 [cited 2015 Jun 6]. Disponible en: <http://science.dodlive.mil/2014/10/13/meet-the-scientist-dr-richard-vaia/>
46. Rak MJ, Saade NK, Friscic T, Moores A. Mechanosynthesis of ultra-small monodisperse amine-stabilized gold nanoparticles with controllable size. *Green Chem*. 2014;16(1):86–9.
47. Haynes CL, Van Duyne RP. Nanosphere Lithography: A Versatile Nanofabrication Tool for Studies of Size-Dependent Nanoparticle Optics. *J Phys Chem B*. 2001;105(24):5599–611.
48. Huang HL, Chen J-K, Houg MP. Using soft lithography to fabricate gold nanoparticle patterns for bottom-gate field effect transistors. *Thin Solid Films*. 2012;524:304–8.
49. Tavakoli a., Sohrabi M, Kargari A. A review of methods for synthesis of nanostructured metals with emphasis on iron compounds. *Chem Pap*. 2007;61(3):151–70.
50. Pyrz WD, Buttrey DJ. Particle Size Determination Using TEM: A Discussion of Image Acquisition and Analysis for the Novice Microscopist. *Langmuir*. 2008;24(20):11350–60.
51. Turkevich J, Stevenson PC, Hillier J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of Colloidal Gold. *Discuss Faraday Soc*. 1951;11:55–75.

52. Zabetakis K, Ghann WE, Kumar S, Daniel MC. Effect of high gold salt concentrations on the size and polydispersity of gold nanoparticles prepared by an extended Turkevich-Frens method. *Gold Bull.* 2012;45(4):203–11.
53. Ji X, Song X, Li J, Bai Y, Yang W, Peng X. Size Control of Gold Nanocrystals in Citrate Reduction: The Third Role of Citrate Size Control of Gold Nanocrystals in Citrate Reduction: The Third Role of Citrate. *J Am Chem Soc.* 2007;129(8):13939–48.
54. Frens G. Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions. *Nat Phys Sci.* 1973;241:20–2.
55. Patungwasa W, Hodak JH. pH tunable morphology of the gold nanoparticles produced by citrate reduction. *Mater Chem Phys.* 2008;108(1):45–54.
56. Pierre AC. *Introduction to Sol-Gel Processing.* US: Kluwer Academic Publishers; 1998. pp 92-103.
57. Haiss W, Thanh NTK, Aveyard J, Fernig DG. Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV - Vis Spectra. *Anal Chem.* 2007;79(13):4215–21.
58. Zeng S, Yong K-T, Roy I, Dinh X-Q, Yu X, Luan F. A Review on Functionalized Gold Nanoparticles for Biosensing Applications. *Plasmonics.* 2011;6(3):491–506.
59. Xia F, Zuo X, Yang R, Xiao Y, Kang D, Vallée-Bélisle A, et al. Colorimetric detection of DNA, small molecules, proteins, and ions using unmodified gold nanoparticles and conjugated polyelectrolytes. *Proc Natl Acad Sci.* 2010;107(24):10837–41.
60. Liu S, Luo H, Li N, Liu Z, Zheng W. Resonance Rayleigh scattering study of the interaction of heparin with some basic diphenyl naphthylmethane dyes. *Anal Chem.* 2001;73(16):3907–14.
61. Liang A, Wei Y, Wen G, Yin W, Jiang Z. A new resonance Rayleigh scattering method for trace Pb, coupling the hydride generation reaction with nanogold formation. *RSC Adv.* 2013;3(31):12585.
62. Ly NH, Joo S-W. Hg(II) Raman sensor of poly-L-lysine conformation change on gold nanoparticles. *BioChip J.* 2014;8(4):303–9.
63. Truong PL, Ma X, Sim SJ. Resonant Rayleigh light scattering of single Au nanoparticles with different sizes and shapes. *Nanoscale.* 2014;6(4):2307–15.

64. Conde J, Ambrosone A, Sanz V, Hernandez Y, Marchesano V, Tian F. Design of multifunctional gold nanoparticles for in vitro and in vivo gene silencing. ACS Nano. 2012;6(9):8316–24.
65. Ojea-Jiménez I, López X, Arbiol J, Puentes V. Citrate-Coated Gold Nanoparticles As Smart Scavengers for Mercury(II) Removal from Polluted Waters. ACS Nano. 2012;6(3):2253–60.
66. Presidente de la República. DS N° 031-2010-SA. Reglamento de la Calidad del Agua para Consumo Humano [Internet]. Perú: Diario Oficial El Peruano N° 548600-5; 2011. Disponible en <http://www.minam.gob.pe/calidadambiental/wp-content/uploads/sites/22/2013/10/DS-N%C2%BA-031-2010-SA-Reglamento-Agua-Consumo-Humano.pdf>