

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ

ESCUELA DE POSGRADO



Desarrollo y optimización de un sensor químico portátil basado en la transferencia de energía entre nanopartículas de oro y rodamina B como agente fluorescente para la determinación de cianuro (CN⁻) en soluciones acuosas

TESIS PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN QUÍMICA

Autor

LORENA AMELIA VELIZ PORTAL

Asesor

DR. YVES PAUL COELLO DE LA PUENTE

San Miguel, 2018

Resumen

El anión cianuro es un compuesto inorgánico que se origina de forma natural o antropogénica, y tiene la facilidad de transportarse largas distancias al estar presente, en pequeñas proporciones, dentro de las partículas de polvo que pueden desplazarse por el aire con facilidad. Este ion es altamente utilizado en la industria metalúrgica y en la extracción de oro y plata cuyos efluentes son luego desechados en las fuentes de agua más cercanas. En nuestro país existen innumerables mineras informales dedicadas a la extracción de oro utilizando cianuro. Estas empresas ponen en riesgo a las poblaciones y al medioambiente aledaño ya que no cuentan con medidas de seguridad y planes de contingencia, ni obedecen las regulaciones del estado. Hasta el día de hoy se han desarrollado numerosos métodos analíticos para la determinación de cianuro; sin embargo, la mayoría de ellos requieren largos tiempos de preparación de muestras y un análisis o instrumentación costosa. Frente a ello han surgido nuevas posibilidades para la detección del anión cianuro, entre ellos los ensayos colorimétricos y de fluorescencia basados en nanomateriales. Estos permiten una cuantificación con bajos límites de detección de manera rápida, precisa y con un tratamiento de muestra sencillo. En este trabajo se desarrolló y optimizó un nanosensor de nanopartículas de oro, caracterizadas por medio de las espectroscopía de UV-Vis y microscopía de fuerza atómica, basado en la transferencia de energía empleando un fluoróforo de bajo costo, la rodamina B, para la detección de cianuro. El sensor fue monitoreado por fluorescencia y demostró ser sensible y selectivo a cianuro obteniéndose un límite de detección de 2 μM . A su vez, el sensor se implementó en una plataforma portátil sin que esto comprometa la sensibilidad de su respuesta incluso en presencia de muestras de matrices complejas.

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a mi familia. Por haberme acompañado a lo largo de esta carrera y llenarme de ánimos constantes. Gracias a mi padre, Marco, y a mi hermana Isabel, quienes me han apoyado incondicionalmente durante toda mi vida. Gracias a mis abuelos por confiar en mí y siempre sacarme una sonrisa. Por último, gracias a mi Madre, Marlene, porque aunque no puedo verte físicamente, sé que eres la que más disfruta con la culminación de esta etapa, gracias por enseñarme a ser fuerte y seguir adelante a pesar de las dificultades.

En segundo lugar a William, por el amor, la paciencia, comprensión, los ánimos, y por haberme acompañado en los momentos más difíciles a lo largo de este proceso. Sin su apoyo este trabajo tampoco hubiera sido posible.

Al programa Ciencia Activa del Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC) quien gracias al convenio 231-2015 FONDECYT y junto a la Pontificia Universidad Católica del Perú (PUCP) me otorgaron la beca para cursar mis estudios de Maestría en Química.

A mi asesor, el Dr. Yves Coello, cuya guía fue indispensable para la culminación de la tesis. Por su dedicación, paciencia y buena disposición al responder cada una de mis preguntas y las explicaciones brindadas a lo largo de este trabajo.

A la Dra. Yulán Hernández quien junto con el Dr. Coello, estuvo pendiente de este trabajo compartiendo sus conocimientos sobre nanopartículas y cuyas opiniones y consejos me sirvieron para realizar de la mejor manera esta investigación.

A la Dra. Betty Galarreta, por haberme brindado la oportunidad de realizar una pasantía en el Instituto de Fotónica de Leibniz (IPHT) como parte de uno de sus proyectos de investigación (N°012-2017-FONDECYT). La experiencia me ha ayudado a definir el camino que quiero seguir como investigadora.

A los profesores de la Maestría en Química, en especial a la Dra. Patricia Morales, por su constante dedicación a la dirección de la Maestría y quién

siempre está en busca de nuevas oportunidades para los alumnos de esta especialidad.

A la Lic. Milka Cajahuanca a quien no sólo agradezco su amabilidad y ayuda en el manejo de los equipos de UV-Vis durante este trabajo, sino también por su constante apoyo a lo largo de toda mi carrera. Gracias también a Nicolás Astoquillca y Gilmer Barrantes por los ánimos y buen humor.

A Glibver y Miguel V., mis compañeros en el laboratorio por los buenos ratos que pasamos, las bromas y el apoyo en estos dos años que compartimos.

Finalmente, a mis compañeros becarios, en especial a Marvin, Miguel M. y Carlos, por las risas y su constante buen humor a lo largo de la tesis.



Índice General

Índice General.....	i
Índice de Figuras.....	iv
Índice de Tablas.....	vii
Abreviaturas.....	viii
1. Introducción.....	1
2. Objetivos.....	3
2.1 Objetivo general.....	3
2.2 Objetivos específicos.....	3
3. Marco Teórico.....	4
3.1 Nanomateriales.....	4
3.1.1 Propiedades de las AuNPs.....	6
3.1.1.1 Resonancia del plasmón de superficie localizado.....	7
3.1.2 Síntesis de las AuNPs.....	8
3.1.3 Caracterización de AuNPs.....	10
3.1.4 Funcionalización de AuNPs.....	11
3.2 Detección de cianuro en agua.....	12
3.2.1 Métodos generales.....	12
3.2.2 Métodos colorimétricos y de fluorescencia.....	14
3.2.3 Nanosensores para la detección de cianuro.....	15
3.2.3.1 Nanosensores de absorción y dispersión.....	15
3.2.3.2 Nanosensores basados en la transferencia de energía.....	16
4. Parte Experimental.....	20
4.1 Reactivos utilizados, materiales y equipos.....	20
4.1.1 Reactivos y materiales.....	20
4.1.2 Equipos.....	21
4.2 Metodologías.....	22
4.2.1 Síntesis de AuNPs.....	22
4.2.2 Caracterización de AuNPs mediante espectroscopía UV-Vis... ..	22

4.2.3	Caracterización de AuNPs mediante AFM.....	23
4.2.4	Funcionalización de AuNPs con rodamina B	23
4.2.4.1	Protocolo de funcionalización inicial	23
4.2.4.2	Protocolo de funcionalización propuesto.....	23
4.2.5	Detección de cianuro	24
4.2.5.1	Protocolo de detección inicial.....	24
4.2.5.2	Protocolo de detección propuesto.....	24
4.2.5.3	Optimización del protocolo de detección propuesto.....	25
4.2.6	Estudio de interferentes	25
4.2.8	Análisis de muestras reales	27
4.3	Resultados Experimentales.....	28
4.3.1	Síntesis y caracterización de AuNPs por espectroscopía UV-Vis	28
4.3.2	Caracterización de AuNPs por microscopía de fuerza atómica	29
4.3.3	Estudio de AuNPs, RB y cianuro mediante espectroscopia UV-Vis.....	30
4.3.4	Estudio de AuNPs, RB y cianuro mediante espectroscopía.....	31
	Raman	31
4.3.5	Estudio de AuNPs, RB y cianuro mediante fluorescencia.....	32
4.3.5.1	Efecto de la presencia de buffer durante la funcionalización ..	34
4.3.5.2	Prueba de distintas concentraciones de rodamina B	35
4.3.5.3	Pruebas preliminares con cianuro.....	36
4.3.5.4	Efecto del tiempo	39
4.3.5.5	Curva de calibración para el sensor de 3 nM AuNPs y 600 nM RB.....	40
4.3.5.6	Curva de calibración para el sensor de 3 nM AuNPs y 900 nM RB.....	41
4.3.6	Análisis de interferentes.....	44
4.3.6.1	Efecto de la dureza del agua	44
4.3.6.2	Efecto del EDTA sobre la curva de calibración	46
4.3.6.3	Análisis de cationes y aniones	47
5.	Discusión de resultados.....	52
5.1	Síntesis y caracterización de AuNPs de 14 nm.....	52
5.2	Ensayos de interacción entre los reactivos	52
5.3	Funcionalización de AuNPs con rodamina B	54

5.4	Detección de cianuro.....	56
5.5	Estudio de interferentes	57
5.6	Estudio de portabilidad.....	58
5.7	Aplicación del sensor en muestras reales	58
6.	Conclusiones y recomendaciones.....	59
6.1	Conclusiones.....	59
6.2	Recomendaciones.....	60
7.	Referencias Bibliográficas.....	61



Índice de Figuras

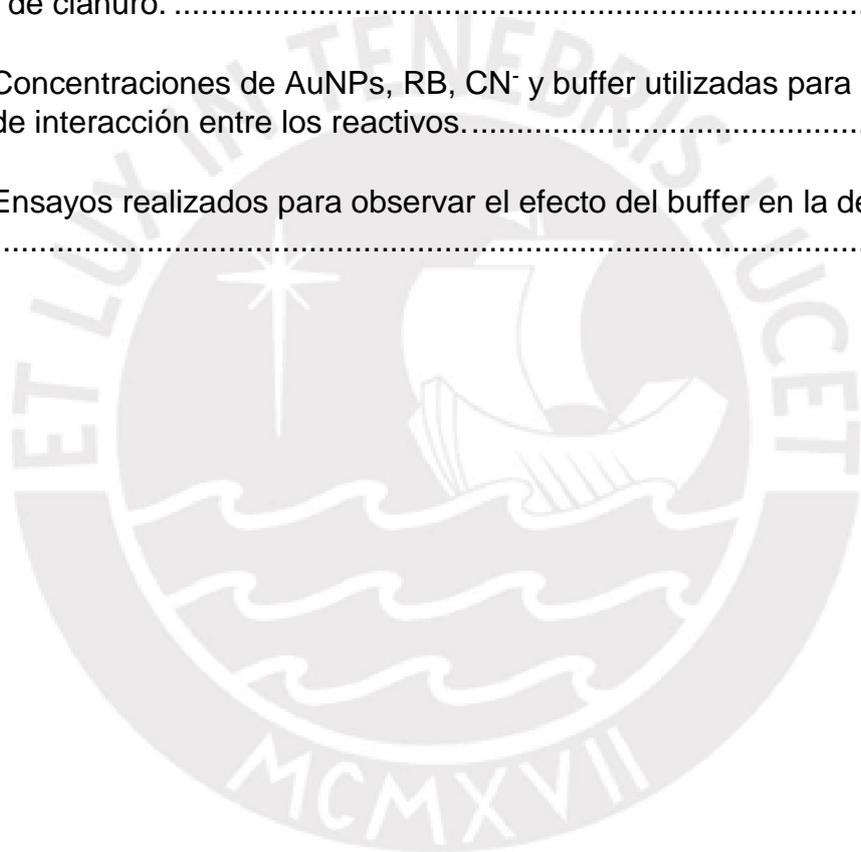
Figura 1. Algunos ejemplos de materiales a nanoescala.	5
Figura 2. Copa de Lycurgus.	6
Figura 3. Representación esquemática de la resonancia del plasmón superficial localizado (LSPR).....	8
Figura 4. Esquema de los métodos <i>top down</i> y <i>bottom up</i> para la síntesis de AuNPs.	9
Figura 5. Esquema de la síntesis de AuNPs utilizando citrato como agente reductor y estabilizante.	10
Figura 6. Micrografías TEM de nanopartículas de oro de diferentes tamaños (a) 14nm, (b) 40 nm y (c) 80 nm. (d) Espectros UV-Vis de las AuNPs anteriores. 11	11
Figura 7. Representación esquemática del proceso de transferencia de energía entre el donador (D) y el aceptor (A).	16
Figura 8. Representación esquemática del proceso de transferencia de energía de superficie entre las AuNPs y el fluoróforo rodamina 6G.	17
Figura 9. Mecanismo de transferencia de energía para el sensor de AuNPs-RB en presencia del CN ⁻	18
Figura 10. Esquema de síntesis para las AuNPs basada en el método de Turkevich-Frens.	22
Figura 11. Esquema del espectrómetro de fluorescencia portátil que consta de un láser, miniespectrómetro, portacubetas y software para los ensayos de portabilidad y muestras reales.....	26
Figura 12. Espectro de extinción de las AuNPs obtenidas mediante el método de Turkevich-Frens.	28
Figura 13. Caracterización de las AuNPs mediante AFM a) Micrografía AFM de las AuNPs sintetizadas. b) Gráfico de distribución de tamaños obtenido para 500 nanopartículas de oro.....	29
Figura 14. Absorbancia del sensor en función de la concentración de KCN en el rango de a) 0 – 200 μ M y b) 0 – 50 μ M.	30

Figura 15. Espectros Raman para el sensor de RB (50 μ M) y AuNPs (4 nM) y su respuesta frente a diferentes concentraciones de CN^-	31
Figura 16. Curvas de fluorescencia para el sensor de 150 nM RB y AuNPs 1 nM. Finalizada la funcionalización se realizó la prueba del sensor con KCN 100 μ M ($\lambda_{\text{excitación}} = 520 \text{ nm}$).	33
Figura 17. Comparación de intensidad de fluorescencia en respuesta a la presencia de cianuro entre un sensor con buffer (CB) y sin buffer (SB) en la funcionalización.....	34
Figura 18. Intensidad de fluorescencia de diferentes concentraciones de RB en presencia de AuNPs a) 1 nM y b) 3 nM.....	35
Figura 19. Efecto del volumen del sensor a) 3 nM AuNPs y 600 nM RB y b) 3 nM AuNPs y 900 nM RB frente a una concentración de CN^- de 100 μ M.	37
Figura 20. Respuesta de cada sensor (3 nM AuNPs + RB) frente a 100 μ M KCN.....	38
Figura 21. Gráficos de intensidad vs tiempo para cada concentración de KCN (10 μ M, 25 μ M y 100 μ M) efectuados con el sensor de 3 nM AuNPs y 600 nM RB.	39
Figura 22. Curva de calibración correspondiente al sensor 3 nM AuNPs y 600 nM RB frente a diferentes concentraciones de KCN.	40
Figura 23. Curva de calibración del sensor de 3 nM AuNPs y 600 nM RB con patrones de KCN de 0 – 25 μ M.....	41
Figura 24. Primera curva de calibración para el sensor de 3 nM AuNPs y 900 nM RB con patrones de KCN de 0 – 25 μ M KCN.....	42
Figura 25. Emisión fluorescente del sensor con y sin centrifugación previa....	43
Figura 26. Curva de calibración del sensor de 3 nM AuNPs y 900 nM RB con patrones de KCN de 0 – 25 μ M.....	43
Figura 27. Efecto de los cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} en la detección de KCN.....	44
Figura 28. Análisis del efecto de la dureza del agua en la respuesta del sensor en presencia de EDTA con concentraciones de a) 1.5 mM. b) 3 mM.	45
Figura 29. Gráfico de análisis de interferentes para ambos iones (Ca^{2+} y Mg^{2+}) en presencia y ausencia de EDTA 3 mM.	46

Figura 30. Análisis del efecto del EDTA en las curvas de calibración del sensor de 3 nM AuNPs y 900 nM RB.....	47
Figura 31. Análisis de interferentes en ausencia y presencia de EDTA. a) Ensayos sin EDTA. b) Ensayos con EDTA.	48
Figura 32. Efecto del Hg ²⁺ como interferente en el ensayo de detección de cianuro.	49
Figura 33. Análisis de la portabilidad del sensor para la detección de cianuro. a) Curva de calibración obtenida en el espectrofluorímetro Perkin Elmer LS 55. b) Curva de calibración obtenida en el espectrofluorímetro portátil.....	50
Figura 34. Análisis del contenido de KCN en muestras reales. a) Detección de KCN en el espectrofluorímetro PE LS 55. b) Detección de KCN en el equipo portátil.	51
Figura 35. Formación del complejo Au(CN) ²⁻ por interacción de AuNPs con el anión CN ⁻	53
Figura 36. Estructura de la molécula de Rodamina B	54
Figura 37. Restablecimiento de la fluorescencia a partir de la desorción de la Rodamina B debido a la corrosión de las AuNPs ocasionada por el anión CN ⁻	56

Índice de Tablas

Tabla 1. Lista de reactivos utilizados para la síntesis de AuNPs y para la detección de cianuro.	20
Tabla 2. Concentraciones de AuNPs, RB, CN ⁻ y buffer utilizadas para los ensayos de interacción entre los reactivos.....	32
Tabla 3. Ensayos realizados para observar el efecto del buffer en la detección de KCN.....	34



Abreviaturas

AFM	Microscopía de fuerza atómica
AgNPs	Nanopartículas de plata
APTES	(3-Aminopropil)trióxido de silano
AuNPs	Nanopartículas de oro
AuNPs–RB	Sensor formado por nanopartículas de oro y rodamina B
CN ⁻	Anión cianuro
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EPA	Agencia de protección ambiental de los Estados Unidos
IPHT	Leibniz Institute of Photonic Technologies
IR	Espectroscopía infrarroja
FRET	Transferencia resonante de energía fluorescente
LSPR	Resonancia del plasmón superficial localizado
Na ₃ Ct	Citrato de sodio
NSET	Transferencia de energía de superficie de nanomateriales
PDCA	Ácido dipicolínico
PUCP	Pontificia Universidad Católica del Perú
RB	Rodamina B
SERS	Espectroscopía Raman amplificada en superficie
SPR	Resonancia del plasmón superficial
UV-VIS	Espectroscopía Ultravioleta-Visible

1. Introducción

El anión cianuro es uno de los venenos más letales que existen en el mundo debido a que inhibe el funcionamiento del complejo mitocondrial citocromo C oxidasa, ocasionando la falta de oxígeno en el organismo y, finalmente, la muerte^{1,2}.

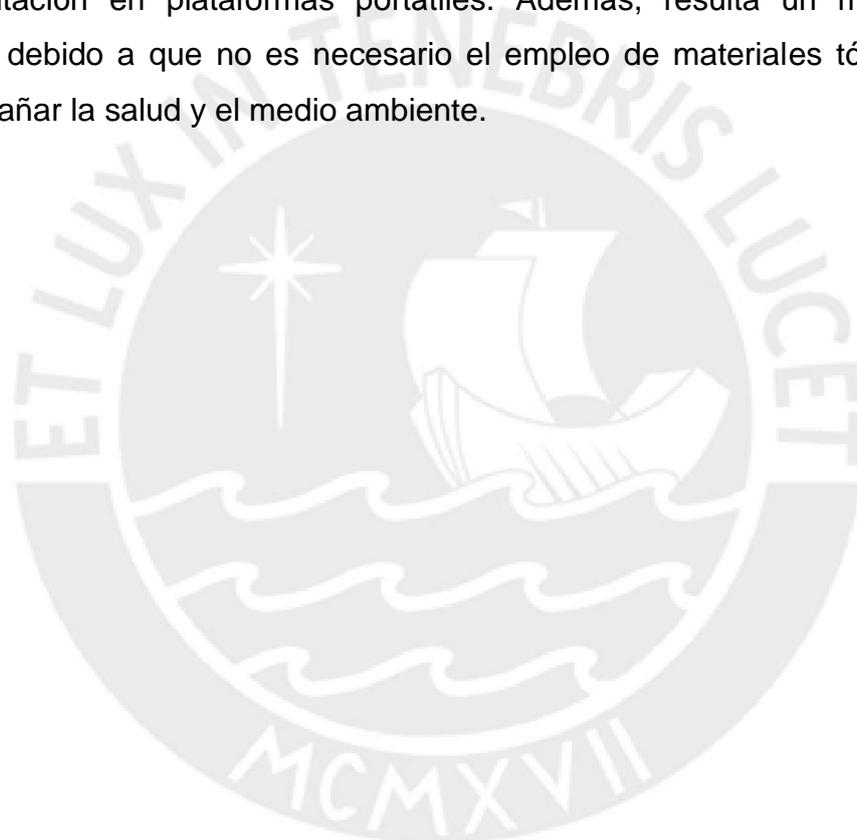
Algunas bacterias, hongos y plantas comestibles contienen cianuro natural tales como las almendras, la soya, la espinaca y las raíces de cassava (conocida en nuestro país como yuca); sin embargo, el contenido de este compuesto en estos alimentos es muy bajo. El cianuro puede encontrarse también como producto de las incineraciones de desechos, en combustibles fósiles, y en procesos de fumigación, entre otros³⁻⁵.

Por otro lado, el cianuro es muy utilizado en la industria metalúrgica y en la extracción de oro y plata en las minas, cuyos efluentes son luego desechados en las fuentes de agua cercanas. Como consecuencia, los efluentes de aguas contaminadas con cianuro pueden ser arrastrados por las corrientes de los ríos, propagando este compuesto^{3,4} cuyo contenido máximo permitido en agua potable, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), es $2.7 \times 10^{-6} \text{ M}^6$.

Hasta el día de hoy se han desarrollado numerosos métodos para la determinación de cianuro, entre ellos, ensayos electroquímicos⁷, de cromatografía⁸ y titulación⁹. Sin embargo, la mayoría de ellos requieren también largos tiempos de preparación de muestras, de análisis y habilidad para llevar a cabo dichos procesos. Posteriormente, la aparición de los sensores colorimétricos hizo posible la detección del analito debido a cambios de color en la solución fácilmente identificables. No obstante, los compuestos orgánicos recientemente sintetizados que son responsables de la variación de color utilizan solventes especiales y largas horas de preparación¹⁰. Frente a ello han surgido nuevas posibilidades de detección para el anión cianuro, entre las que destaca el uso de AuNPs. La gran afinidad del cianuro por el oro, ha permitido emplear nanopartículas de este metal (AuNPs) funcionalizadas con fluoróforos para determinar este anión mediante fluorescencia^{2,11-13}. De esta forma, se ha conseguido cuantificar cianuro a concentraciones muy bajas, de manera rápida, poco costosa, precisa y con un tratamiento de muestra sencillo^{1,11,12}.

Actualmente se han implementado algunos sensores fluorescentes basados en nanomateriales para llevar a cabo la detección de cationes como Hg^{2+} ^{11,14}, y de aniones como CN^{-} ^{1,11,12,14}. Dichos nanomateriales incluyen nanoclusters de oro⁶ y nanopartículas funcionalizadas con ATP¹¹, rodamina 6G¹⁵ y rodamina B^{1,14}.

La optimización e implementación de un sensor químico de fluorescencia basado en la transferencia de energía entre AuNPs y un fluoróforo como la rodamina B resulta una propuesta atractiva frente al problema de identificación de cianuro debido a su simplicidad, alta sensibilidad y su potencial implementación en plataformas portátiles. Además, resulta un método no peligroso debido a que no es necesario el empleo de materiales tóxicos que puedan dañar la salud y el medio ambiente.



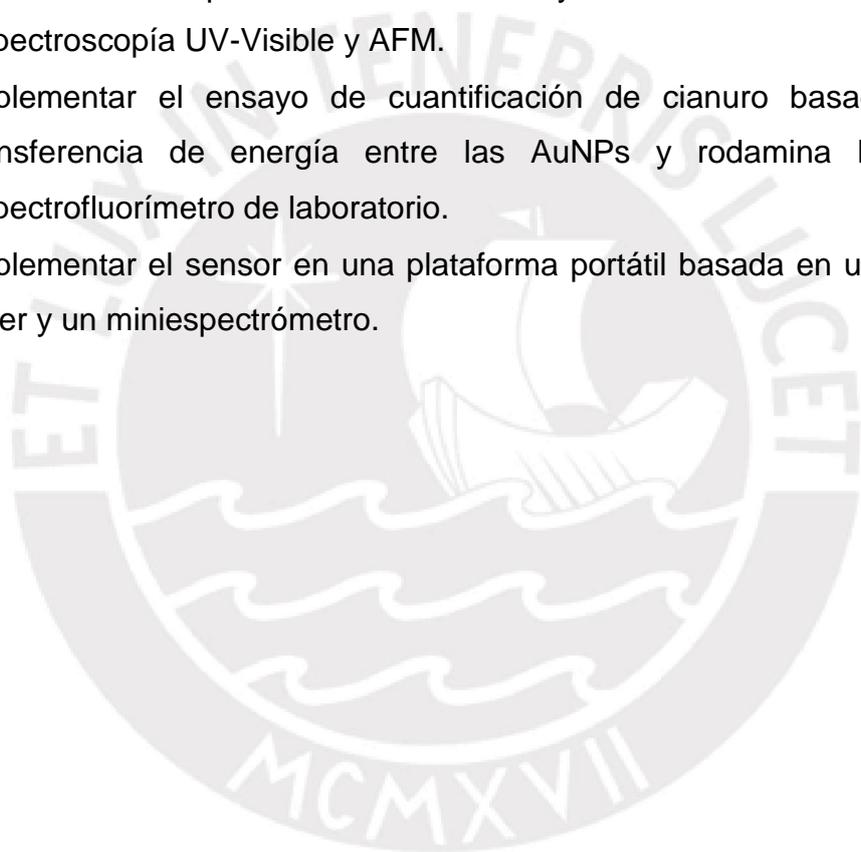
2. Objetivos

2.1 Objetivo general

- Implementar un sensor químico portátil basado en la transferencia de energía entre AuNPs y rodamina B como agente fluorescente para la determinación de cianuro (CN^-) en soluciones acuosas.

2.2 Objetivos específicos

- Sintetizar nanopartículas de oro y caracterizarlas mediante espectroscopía UV-Visible y AFM.
- Implementar el ensayo de cuantificación de cianuro basado en la transferencia de energía entre las AuNPs y rodamina B en un espectrofluorímetro de laboratorio.
- Implementar el sensor en una plataforma portátil basada en un puntero láser y un miniespectrómetro.



3. Marco Teórico

3.1 Nanomateriales

Desde que el término nanotecnología fue mencionado por primera vez en 1959 por el físico cuántico teórico Richard Feynman en su conferencia (*“There’s Plenty of Room at the bottom”*), la evolución de este nuevo campo ha aumentado considerablemente dando lugar a grandes avances e investigaciones en diferentes ramas como la medicina, la óptica, y los materiales, entre otros^{15–18}.

La nanotecnología es una ciencia que se ha dedicado al análisis, la síntesis, la caracterización y la aplicación de diferentes materiales a través de la manipulación de la materia a una escala nanométrica aprovechando las propiedades y fenómenos que ocurren a este nivel.

Se conoce como nanopartículas a aquellas partículas que tienen al menos una dimensión en el rango de tamaños entre 1 y 100 nm, llegando incluso a mostrar un menor tamaño que los virus (Figura 1)¹⁹. Gracias a ello, las nanopartículas exhiben propiedades especiales producto del confinamiento cuántico, en el cual los electrones están obligados a moverse en un área muy pequeña pero comparable a la longitud de onda asociada al electrón de valencia (longitud de onda de Broglie)¹⁷, pasando a ocupar diferentes niveles de energía y, finalmente, modificando la densidad electrónica de los orbitales. Por esta razón, las partículas que poseen tamaños tan minúsculos exhiben propiedades ópticas, magnéticas y eléctricas diferentes en comparación a las partículas de mayor tamaño del mismo material, además de ser mucho más reactivas ya que presentan una mayor área superficial.^{20,21}

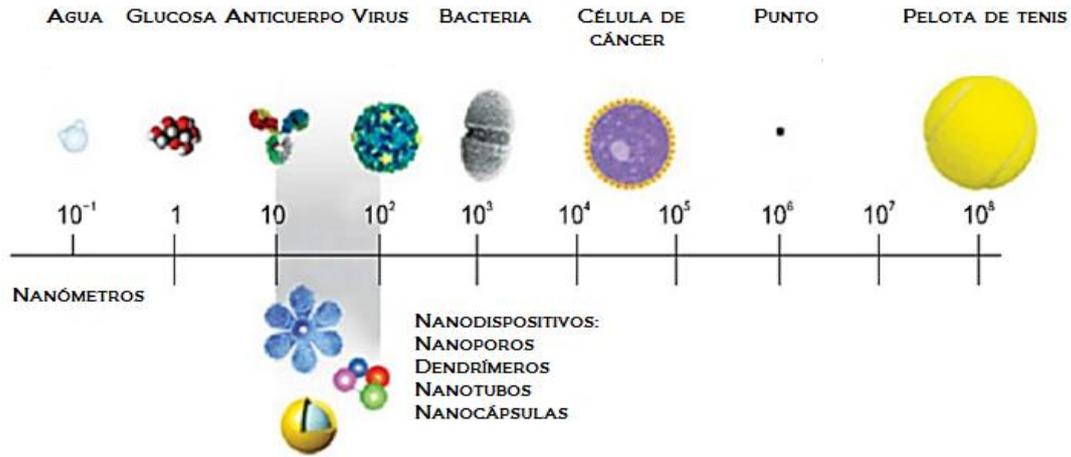


Figura 1. Algunos ejemplos de materiales a nanoescala¹⁹.

Gracias a los atractivos colores que poseen, las AuNPs eran empleadas para la decoración de diversos adornos ornamentales en las civilizaciones antiguas como Roma y Egipto^{20,22}. Es así que resalta el uso de estos nanomateriales para la creación del famoso “vidrio rubí”, usado en la Roma antigua con el fin de dar color a la famosa Copa de Lycurgus (Figura 2) cuyos efectos ópticos especiales en reflexión y transmisión son explicados por la presencia de AuNPs y AgNPs con un tamaño de alrededor de 70 nm²²⁻²⁴. Más adelante durante el siglo XVII, Andreas Cassius sintetizó el pigmento “Púrpura de Cassius”, una aleación de AuNPs y óxido de estaño capaz de brindar una amplia gama de colores, siendo el rojo rubí el más reconocido que aún hoy en día podemos apreciar en cerámicos y vitrales de iglesias, entre otros^{20,25}.



Figura 2. Copa de Lycurgus. Se observa el color verde asociado a AgNPs en presencia de luz reflejada, mientras que si la luz es transmitida el color observado es el rojo asociado a AuNPs²³.

3.1.1 Propiedades de las AuNPs

Conocidas por ser las nanopartículas metálicas más estables²⁰, las AuNPs han sido ampliamente utilizadas en diferentes campos de investigación tales como medicina, bioquímica, medio ambiente, catálisis y óptica. Asimismo, gracias a sus características ópticas, las AuNPs se emplean en el sector de la salud como nanosensores para la detección de tumores malignos²⁶, y en el sector de medio ambiente como sensores colorimétricos y fluorescentes para la detección de iones tóxicos^{1,6,11-15,20,26,27}.

El amplio uso de estas nanopartículas se debe, por un lado, al pequeño tamaño que poseen, otorgándoles un comportamiento de puntos cuánticos de dimensión cero (0-D) cuya estructura electrónica se rige por las leyes de la mecánica cuántica. Este confinamiento cuántico les brinda sus ya conocidas características que dependen también de factores como el tamaño y forma de la nanopartícula, la distancia entre ellas y el ambiente químico en el que se encuentran²⁰. A su vez, las AuNPs pueden ser funcionalizadas de diferentes maneras lo que les confiere gran estabilidad, gracias a lo cual es posible ampliar el rango de aplicaciones.

3.1.1.1 Resonancia del plasmón de superficie localizado

Desde su uso como pigmento para dar color al vidrio hasta la creación de sensores y marcadores químicos en la actualidad, las propiedades ópticas de las nanopartículas de oro y plata y sus atractivos colores han sido siempre motivo de investigación y estudio. Fue a mediados del siglo XIX en donde el físico-químico Michael Faraday precisó que el color de las AuNPs se debía a la presencia del átomo de oro en su composición^{28,29}.

Este fenómeno se debe a que metales como el oro y la plata poseen electrones en orbitales *d* que se encuentran libres y pueden moverse a través de la superficie metálica. Estos electrones son los responsables de la alta conductividad propia de los metales. Al interactuar con un campo electromagnético proveniente de un haz de luz, los electrones libres que se encuentran en la superficie metálica del nanomaterial oscilan dando lugar al fenómeno de resonancia de plasmón superficial (SPR)^{28,29}.

En 1908 Mie explicó teóricamente el fenómeno de resonancia por medio de las ecuaciones de Maxwell para una onda de luz electromagnética que incide sobre una nanoesfera²⁹. Debido a su tamaño, el movimiento de los electrones en la banda de conducción se produce en un espacio pequeño. Al incidir un campo electromagnético en resonancia con el movimiento colectivo de los electrones, se produce la oscilación coherente de los electrones (oscilación en fase)³⁰. Este fenómeno se denomina resonancia del plasmón superficial localizado (LSPR) (Figura 3). Para las AuNPs, la LSPR ocurre en la zona del visible y es la responsable de sus colores característicos. La LSPR puede ser monitoreada mediante técnicas de absorción o dispersión^{20,28-30}.

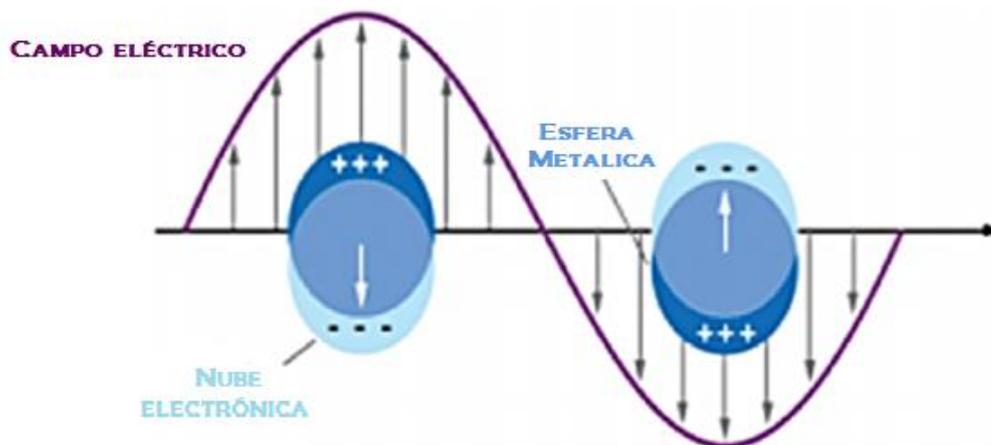


Figura 3. Representación esquemática de la resonancia del plasmón superficial localizado (LSPR)³¹.

La frecuencia de resonancia depende del tamaño y forma de las nanopartículas, así como de la constante dieléctrica del metal y del medio que lo rodea. Las AuNPs poseen grandes coeficientes de extinción ya que, por ejemplo, las AuNPs esféricas de 20 nm presentan un coeficiente de extinción molar(ϵ) de $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, de 3 a 5 veces mayor que los coeficientes de extinción de cromóforos orgánicos comunes²⁸⁻³⁰.

3.1.2 Síntesis de las AuNPs

Existen gran cantidad de métodos de síntesis de nanopartículas, dependiendo de la aplicación para la cual serán utilizadas y del tamaño y forma deseados²⁰.

En la actualidad se tienen dos tipos de rutas generales para la síntesis de AuNPs, la primera de ellas consiste en generar la ruptura del material a nivel macroscópico hasta llegar a formar las nanoestructuras deseadas. La ablación láser, la fotolitografía y la técnica de descarga de arco son ejemplos de esta ruta sintética conocida también como “*top down*”. El segundo, denominado “*bottom up*”, consiste en la formación de nanopartículas a partir del material a nivel atómico, normalmente este sistema involucra procesos de reducción de iones de oro para la producción de átomos^{20,28,29}. En la Figura 4 se presenta un esquema de ambos procesos.

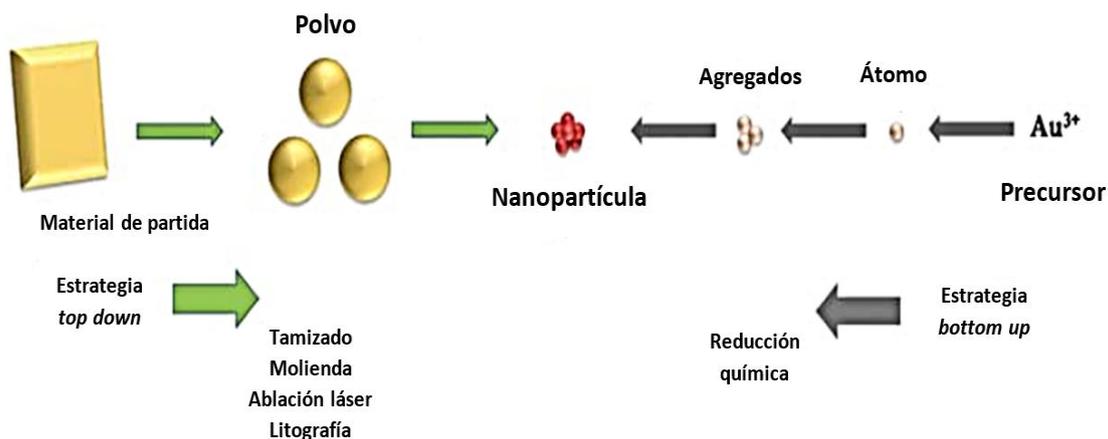


Figura 4. Esquema de los métodos *top down* y *bottom up* para la síntesis de AuNPs²⁸.

La producción de nanopartículas a través de la reducción química se efectúa en dos fases: (i) la reducción de una sal de oro en solución acuosa por medio de agentes reductores como borohidruro o citrato, y (ii) la estabilización de las AuNPs por medio de agentes estabilizadores como compuestos tiolados o el ya conocido citrato, que evitan la aglomeración de las nanopartículas²⁸.

Debido a la doble función del citrato, el método de síntesis de nanopartículas por reducción con citrato de sodio es uno de los más conocidos hasta el día de hoy. Elaborado por Turkevich³² en 1951 y mejorado por Frens³³ en 1973, este método parte de una solución acuosa del ácido tetracloroaurico ($HAuCl_4$) la cual se calienta hasta llegar a ebullición. A continuación, se le agrega citrato de sodio ($Na_3C_6H_5O_7$). Al poco tiempo, aparece el color rojo vino característico de AuNPs esféricas. Gracias al aporte de Frens, se puede modificar la relación oro:citrato haciendo posible el control del tamaño de las nanopartículas en el rango de 15-150 nm^{20,28,29,32-34}.

La reacción general de este método (Figura 5) inicia al tener en solución los iones Au^{+3} , los cuales gracias a los iones citrato se reducen hasta formar $Au(0)$. La oxidación de los iones citrato da lugar a una dicarboxi acetona que se encarga de la estabilización de las nanopartículas cubriendo su superficie y evitando así su agregación. Si la cantidad de citrato añadida es pequeña, esta cobertura no será efectiva y permitirá la agregación y posterior formación de

AuNPs de mayor tamaño; mientras que si la cantidad de citrato es mayor se obtendrán nanopartículas pequeñas y dispersas. Algunos parámetros adicionales como la temperatura, el tiempo y el pH deben ser controlados también si se requieren AuNPs de un tamaño en particular y que sean monodispersas²⁸.

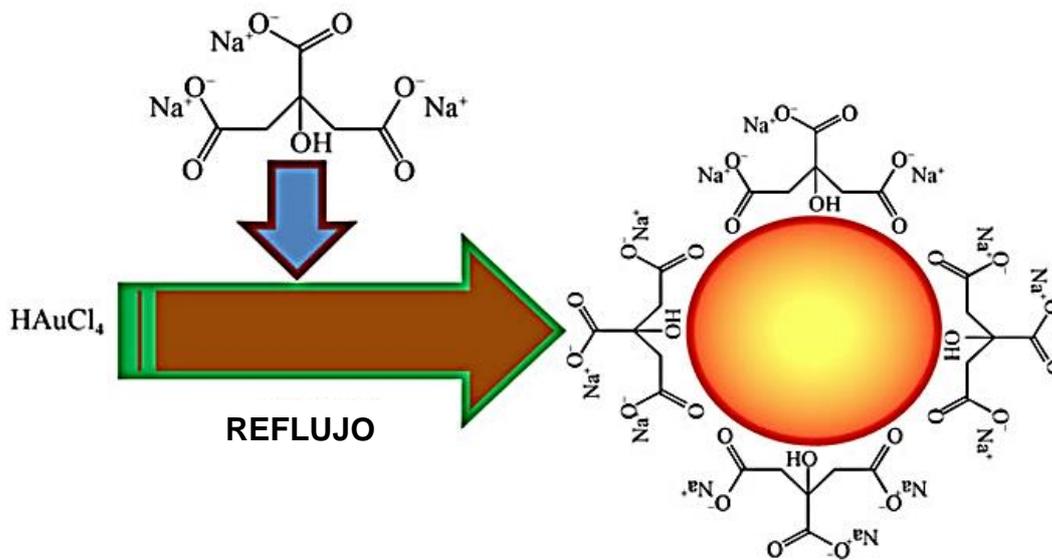


Figura 5. Esquema de la síntesis de AuNPs utilizando citrato como agente reductor y estabilizante³⁵.

3.1.3 Caracterización de AuNPs

Son varias las técnicas utilizadas para la caracterización de nanopartículas, entre las que se encuentran: la microscopía electrónica de transmisión (TEM), la microscopía de fuerza atómica (AFM), y la difracción de rayos X, entre otras^{20,29}. Sin embargo, estudios recientes han logrado establecer una correlación entre las propiedades ópticas de las nanopartículas y su tamaño a través de la espectroscopía UV-Vis, la cual permite caracterizar las AuNPs de manera rápida y sencilla³⁶.

Gracias al trabajo de Haiss y col. en el año 2007, se logró determinar, de manera aproximada, la relación existente entre la longitud de onda del plasmón de superficie y el tamaño de las AuNPs esféricas, mediante un estudio teórico y experimental que tomaba en cuenta la longitud de onda de absorción máxima y

el coeficiente de extinción molar de las nanopartículas. Esta relación puede observarse de manera gráfica en la Figura 6².

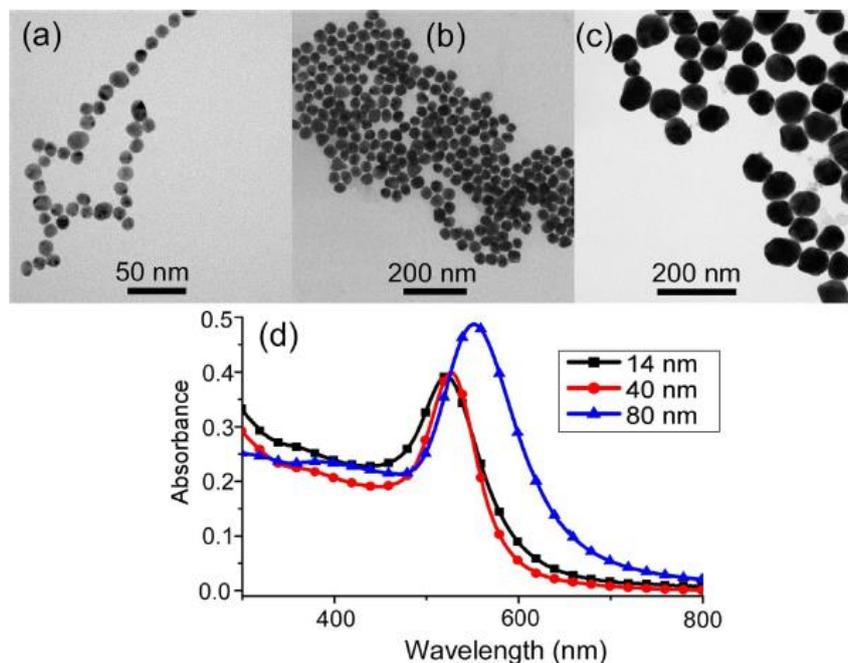


Figura 6. Micrografías TEM de nanopartículas de oro de diferentes tamaños (a) 14nm, (b) 40 nm y (c) 80 nm. (d) Espectros UV-Vis de las AuNPs anteriores².

3.1.4 Funcionalización de AuNPs

Las nanopartículas de oro tienen la ventaja de ser fácilmente funcionalizadas, por lo que pueden ser utilizadas para diferentes propósitos. En el caso de las aplicaciones biomédicas, se pueden funcionalizar las AuNPs con polietilenglicol (PEG), proteínas o anticuerpos para que, por ejemplo, se acumulen en los tejidos cancerosos y cumplan una función terapéutica. A su vez, pueden utilizarse como vehículos para transporte de fármacos y permitir su liberación controlada en el organismo²⁸⁻³⁰.

Además, las modificaciones en la superficie de las AuNPs pueden alterar algunas de sus propiedades como sus características ópticas. Una correcta funcionalización, empleando ligandos específicos, permite la creación de sensores ópticos capaces de identificar y cuantificar una gran variedad de analitos, desde iones tóxicos hasta proteínas, nucleótidos y tumores^{13,16,28}.

3.2 Detección de cianuro en agua

A lo largo de la historia ha existido el interés científico por el estudio de aniones, cationes y iones metálicos, en especial aquellos que cumplen funciones importantes en el campo de la biología, industria y el medio ambiente¹². Por ejemplo, iones como el Ca^{+2} y Fe^{+2} son fundamentales para el buen funcionamiento del cuerpo humano, mientras que los iones de oro, plata y platino destacan por su rareza y gran valor a nivel industrial^{37,38}. Sin embargo, existen algunos iones de metales de transición (Hg^{2+} o Cr^{+3}) y aniones como el cianuro (CN^-) que son, por el contrario, dañinos para todo ser vivo^{3-5,12}.

El ion cianuro inhibe el complejo mitocondrial citocromo C oxidasa, lo que ocasiona la falta de oxígeno en el organismo y, finalmente, la muerte, incluso en dosis pequeñas⁷. A pesar del peligro, el cianuro aún sigue siendo utilizado en procesos mineros y metalúrgicos, en especial la extracción de oro^{3-5,7,39,40}. Anualmente la cantidad de cianuro que se produce llega hasta los 2.6 millones de toneladas³⁹ y gran parte es vertida en ríos, lagos y otras fuentes de agua.

El límite máximo de cianuro permitido en el agua apta para el consumo humano propuesto por la Organización Mundial de la Salud es de $2.7 \times 10^{-6} \text{ M}$ ⁶, y en nuestro país el Ministerio de Salud impone, dentro del DS 031-2010-SA, un valor muy parecido de $2.59 \times 10^{-6} \text{ M}$ ⁴¹. Por lo tanto, es importante el desarrollo de metodologías que permitan identificar el contenido de este ion teniendo en cuenta estos límites de detección. A lo largo de los años los métodos han evolucionado con ayuda de nuevas tecnologías, algunas de las cuales serán descritas más adelante en esta sección.

3.2.1 Métodos generales

La variedad de métodos para la detección de cianuro se ha incrementado con el paso del tiempo, entre los que se encuentran la titulación con plata, métodos electroquímicos y la cromatografía de gases.^{7-9,42}

Fue Justus von Liebig quien en 1851 desarrolló por primera vez un método de titulación para la determinación de cianuro, utilizando plata para la formación del ión argentocianuro y cuyo punto final se apreciaba al aparecer una ligera turbidez producto de este ion⁴³. Más adelante, Dengies modificaría el método utilizando como indicador yoduro de potasio en presencia de hidróxido de

amonio⁴⁴. Ambos métodos son objeto de estudio hasta el día de hoy, pero para su aplicación se debe evitar la interferencia de iones como el tiosulfato ($S_2O_3^{2-}$) pues puede reaccionar con el cianuro y formar el tiocianato (SCN^-)⁴⁴. El límite de detección para estos métodos titrimétricos es de 0.038 M.

Entre los métodos electroquímicos destacan los electrodos selectivos de iones, los cuales ofrecen una respuesta de detección rápida y se pueden obtener de manera comercial⁴³. No obstante, al igual que en los métodos de titulación, se debe evitar la interferencia de los iones sulfito o tiocianato, además de algunos metales que puedan acomplejar con el cianuro. En la actualidad se han desarrollado electrodos de pasta de carbono modificados que han logrado superar estas interferencias, obteniéndose buenos resultados con límites de detección más bajos (9 μ M) que los métodos titrimétricos^{7,42,45}.

El desarrollo de la amperometría ha dado lugar a numerosas técnicas de detección utilizando el electrodo de gota de mercurio para formar el complejo $Hg(CN)_2$, cuya concentración es proporcional a la corriente límite, y que permite monitorear la cantidad de cianuro en efluentes industriales⁴². Las modificaciones más recientes han dado lugar al empleo de AuNPs y AgNPs para la modificación de las superficies de los electrodos, dada la afinidad de estos metales por el cianuro, obteniendo límites de detección menores (1.4×10^{-8} M, con un rango lineal de $1.5 \times 10^{-6} - 2.1 \times 10^{-4}$ M)^{7,46,47}. Sin embargo, para la producción de dichos electrodos se debe asegurar la deposición homogénea de las nanopartículas sobre la superficie y el buen manejo de la técnica de amperometría.

Los métodos basados en cromatografía de gases (GC) cumplen un importante papel en la detección de CN^- , especialmente en muestras biológicas. Los vapores de HCN producidos a partir de la acidificación son recolectados con una fibra de microextracción en fase sólida (SPME)⁴⁸ e ingresados al sistema de cromatografía de gases. La detección puede llevarse a cabo mediante dos detectores; el de fósforo – nitrógeno y el de captura de electrones ECD pero este último requiere una derivatización previa del HCN para convertirlo a ClCN, aprovechando la gran selectividad del detector ECD por los compuestos con halógenos⁴⁹.

Junto con la cromatografía de gases también se han realizado investigaciones para hacer posible la detección de cianuro mediante espectrometría de masas (MS) con dilución isotópica. En este caso se utilizan analitos marcados isotópicamente, como el ^{13}C y el ^{15}N , que son químicamente iguales al analito de la muestra pero que producen diferentes señales en el espectro de masas y que pueden actuar como estándares internos al no producir interferencias⁵⁰.

El límite de detección alcanzado con cromatografía de gases y espectrometría de masas es, aproximadamente, 1.1×10^{-8} M. No obstante, la desventaja principal de ambas técnicas es la costosa implementación de los equipos GC y MS⁷.

3.2.2 Métodos colorimétricos y de fluorescencia

Los métodos colorimétricos han tomado mayor relevancia debido a su bajo costo y a la facilidad con la cual los cambios pueden ser detectados a simple vista. Para el desarrollo de estos sensores, los investigadores aprovechan la alta capacidad nucleofílica y la facilidad de actuar como un ligando del anión cianuro^{6,7,10,51-53}.

Männel-Croisé y col. estudiaron la acción de la cobinamida, un complejo de cobalto, sobre diferentes cantidades de cianuro, logrando crear un sensor basado en la afinidad del metal por el CN^- y cuyos cambios de color eran fácilmente identificables dependiendo de la cantidad de anión agregado (hasta $10 \mu\text{M}$)⁵⁴.

Los sensores colorimétricos pueden ser utilizados conjuntamente con la técnica de UV-Vis para resultados más cuantitativos. Tomasulo y col. diseñaron una oxazina cromogénica, la cual se transformaba en el 4-nitrofenilazofenolato en respuesta al cianuro⁵³. Más adelante Odago y Colabello desarrollaron un sensor formado por un derivado del trans-1,2-ditioureaciclohexano, al cual se le acoplaba una molécula p-nitrofenil como cromóforo¹⁰. El sensor se basa en un mecanismo de transferencia de carga desde el nitrógeno de la tiourea hacia el grupo p-nitrofenil, para finalmente formar un complejo con el cianuro. Este sensor resultó selectivo para cianuro, mostrando un color rojo, aún en presencia de otros aniones como bromuro (Br^-) o yoduro (I^-). Sin embargo, la desventaja de algunos

de los métodos colorimétricos más recientes radica en las complejas síntesis orgánicas para obtener los compuestos como la oxazina, además de requerir el uso de solventes especiales. Es por esta razón que se han implementado nuevas metodologías¹⁰.

Los sensores basados en fluorescencia han demostrado ser una buena opción por sus bajos costos y a la facilidad con la que pueden ser puestos en funcionamiento para la detección de algún analito⁶. Algunos de los trabajos más recientes como el de Cheng y col. permitieron el desarrollo de un sensor basado en la dipiridilamina, cuya fluorescencia amarillo-verdosa característica se ve inhibida en su totalidad al formar un complejo con el ion Cu^{2+} ⁵⁵. Al añadirse CN^- , el complejo desaparece, debido a la gran afinidad entre el cianuro y el cobre, y la fluorescencia se recupera. Similar trabajo realizaron Shan y col. con derivados cumarínicos en lugar de dipiridilamina como base para sus sensores²⁷.

3.2.3 Nanosensores para la detección de cianuro

Como se ha mencionado con anterioridad las AuNPs poseen propiedades ópticas especiales debidas a la LSPR y a la gran facilidad para ser funcionalizadas. Es por esta razón, que las AuNPs resultan atractivas para la preparación de sensores sensibles, selectivos y económicos que puedan detectar diferentes tipos de compuestos^{1,6,11,12,14,15,29,56}.

3.2.3.1 Nanosensores de absorción y dispersión

La agregación de las AuNPs esféricas da lugar a un cambio de color de rojo a azul. Debido a ello, muchos nanosensores colorimétricos se basan en la agregación o redispersión de las nanopartículas²⁸. Liu y col. desarrollaron un sensor colorimétrico basado en la agregación de las AuNPs debido a la erosión de su superficie al contacto con cianuro que ocasiona la desorción del estabilizante (PS-40). El desplazamiento de la banda LSPR hacia longitudes de onda mayores fue fácilmente monitoreado utilizando UV-Vis⁵⁷.

Por otro lado, Hernández y col. diseñaron un sensor basado en la dispersión Rayleigh para la detección de cianuro utilizando AuNPs de diferentes tamaños funcionalizadas con PS-40, el cual les permitió alcanzar una sensibilidad en el rango nanomolar².

3.2.3.2 Nanosensores basados en la transferencia de energía

Desde hace algunos años, se ha estudiado el comportamiento de las nanopartículas como inhibidores de fluorescencia por medio de un mecanismo de transferencia de energía^{11,13-15,58-64}. La transferencia resonante de energía fluorescente (FRET) es una técnica espectroscópica utilizada para estudiar las interacciones entre dos especies fluorescentes^{13-15,58,64,65}, los cambios en distancia y conformación entre compuestos y la identificación de sitios activos en macromoléculas como las proteínas y ácidos nucleicos^{14,35,58,64}. En el proceso FRET participan dos especies, el donador (D) excitado transfiere la energía de excitación a un aceptor (A) de manera no radiativa, gracias a interacciones dipolo-dipolo entre ambas especies (Figura 7)^{59,60,66}.

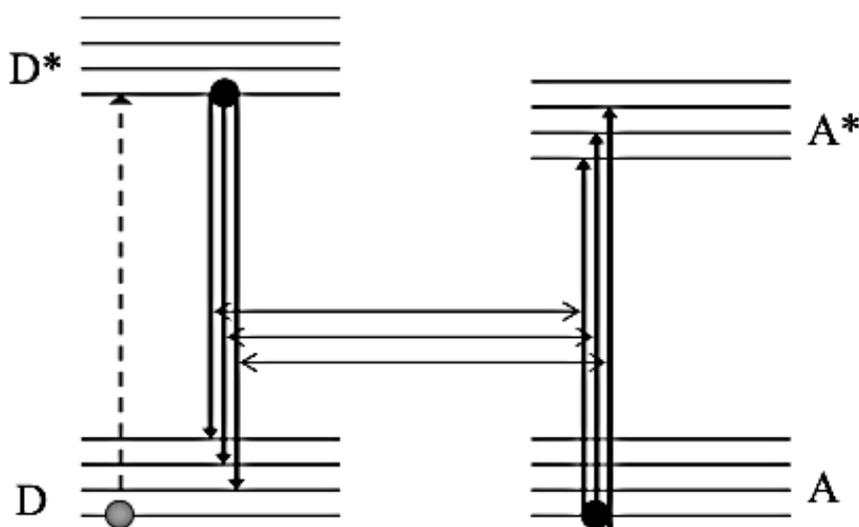


Figura 7. Representación esquemática del proceso de transferencia de energía entre el donador (D) y el aceptor (A)⁶⁰.

El proceso FRET es fuertemente dependiente de la distancia entre el donador y el aceptor con una relación de $(1/d^6)$, ya que involucra una transición electrónica resonante entre ambas especies. Por esta razón, se encuentra limitado a distancias no mayores a 100 Å, de lo contrario la transferencia de energía es muy pobre o nula^{15,62}.

Por otro lado, algunos investigadores han estudiado el proceso de transferencia de energía entre moléculas fluoróforas y nanopartículas, el cual sigue un mecanismo similar a FRET. El proceso conocido como transferencia de

energía de superficie de nanopartículas o NSET¹⁴, se genera debido a la fuerte interacción de los electrones superficiales libres del nanometal aceptor y el dipolo de un fluoróforo donador (Figura 8)^{14,15,63}.

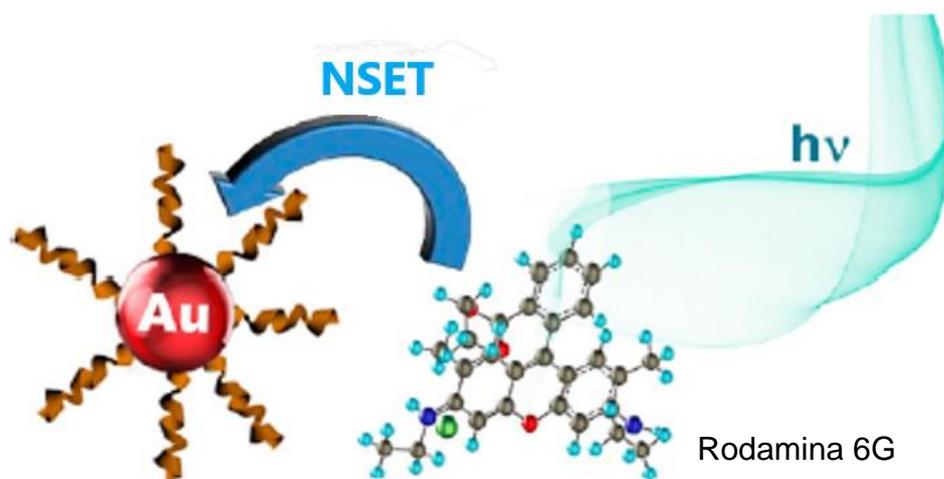


Figura 8. Representación esquemática del proceso de transferencia de energía de superficie entre las AuNPs y el fluoróforo rodamina 6G⁶³.

El proceso NSET no requiere del acoplamiento de transiciones electrónicas resonantes del donador y aceptor, sino solo de la buena interacción entre los electrones del metal y el dipolo del fluoróforo. Es por ello que es menos dependiente de la distancia, con una relación de $1/d^4$, lo cual le ha permitido superar los límites de FRET haciendo efectiva la transferencia de energía en distancias mayores a 100 \AA ^{14,58,62}. Según el tipo de acción inhibitoria se pueden dar dos tipos, inhibición estática o dinámica. En la inhibición estática se forma un complejo entre el fluoróforo (donador) y el inhibidor no fluorescente en estado basal (aceptor – nanopartícula)^{67,68}. Por el contrario, en la inhibición dinámica no se forma ningún complejo, sino que la transferencia se da por medio de las colisiones entre el donador y el aceptor durante el tiempo de vida del estado excitado^{14,69}. En los sensores químicos desarrollados, se observó que las AuNPs se comportaban como aceptores y que el tipo de inhibición era estática⁶⁷.

Las nanopartículas de oro han demostrado ser muy buenos inhibidores de fluorescencia debido a sus altos coeficientes de extinción molar en el rango visible¹⁴. Dulkeith y col. realizaron las primeras investigaciones logrando inhibir la fluorescencia de la lisamina mediante su unión con nanopartículas de oro de 1 nm de diámetro debido a la transferencia de energía entre el dipolo de la

lisamina y la superficie del metal⁷⁰. En el año 2007, Sen y col. estudiaron un proceso similar para la rodamina 6G y AuNPs cuyos resultados experimentales concordaban con los principios de la transferencia de energía de superficie⁶³.

En la actualidad, NSET se utiliza para seguir los cambios conformacionales de biomoléculas grandes, como los nucleótidos, de manera rutinaria. Algunos ejemplos son las investigaciones realizadas por Yun y Jennings, en las cuales se trabajó con cadenas de ADN de distintas longitudes a las que se les acopló una molécula de fluoresceína como fluoróforo y se estudiaron los mecanismos FRET y SET al interactuar con AuNPs^{58,61,62}.

También se han reportado algunos estudios basados en la transferencia de energía de superficie entre las AuNPs y fluoróforos como la Rodamina B para la detección de iones de mercurio (Hg^{2+}), dando eficiencias de inhibición de casi el 100%. Cuando la rodamina está adsorbida en la superficie de las AuNPs. Sin embargo, después de agregar pequeñas cantidades del catión de Hg (II), la rodamina es liberada de la superficie de las nanopartículas y por lo tanto la señal de fluorescencia se restablece¹⁴. Un proceso similar se ha observado también en el caso de cianuro. Esta molécula disuelve parte de la superficie de las AuNPs y produce la liberación del fluoróforo, gracias a lo cual se puede detectar la fluorescencia (Figura 9)¹.

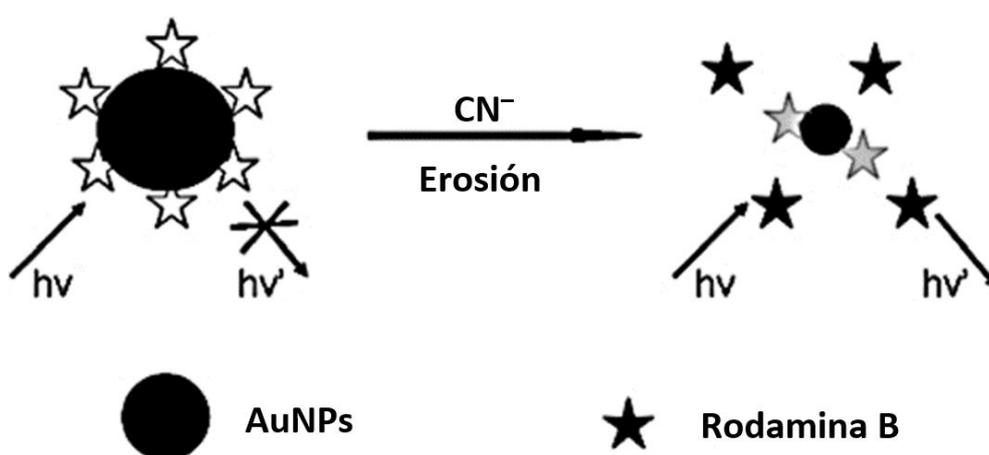


Figura 9. Mecanismo de transferencia de energía para el sensor de AuNPs-RB en presencia del CN^- .

Adicionalmente a ello, se han creado sensores de nanopartículas de oro fluorescentes estabilizadas con albúmina (BSA) para la detección de hasta 10^{-7} M de cianuro después de optimizar algunos parámetros como la concentración, el tiempo de interacción y el pH⁶.

De esta forma, el estudio de la transferencia de energía y de la capacidad de inhibición fluorescente de las nanopartículas ha abierto el camino para el desarrollo de nanosensores basados en estas propiedades, especialmente para la detección de iones peligrosos como los ejemplos discutidos previamente.



4. Parte Experimental

4.1 Reactivos utilizados, materiales y equipos

4.1.1 Reactivos y materiales

Los reactivos utilizados para la síntesis de las AuNPs y para la detección de CN⁻ se pueden visualizar en la tabla 1.

Tabla 1. Lista de reactivos utilizados para la síntesis de AuNPs y para la detección de cianuro.

Reactivo	Fórmula	Marca	Grado de pureza
Citrato de sodio dihidratado	Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ ·2H ₂ O	JT Baker	P.A.
Ácido tetracloroáurico trihidratado	HAuCl ₄ ·3H ₂ O	Sigma - Aldrich	≥ 99.9%
Rodamina B	C ₂₈ H ₃₁ ClN ₂ O ₃	Sigma - Aldrich	≥ 99.9%
Bicarbonato de sodio	NaHCO ₃	Scharlau	P.A.
Carbonato de sodio	Na ₂ CO ₃	JT Baker	P.A.
Hidróxido de sodio	NaOH	Merck	P.A.
Cianuro de potasio	KCN	Merck	99.98%
Sulfato de sodio	Na ₂ SO ₄	JT Baker	P.A.
Nitrato de plomo	Pb(NO ₃) ₂	Merck	99.98%
Fluoruro de sodio	NaF	Merck	P.A.
Cloruro de potasio	KCl	Scharlau	P.A.
Sulfato de hierro (II) heptahidratado	FeSO ₄ ·6H ₂ O	Scharlau	P.A.
Cloruro de hierro (III) hexahidratado	FeCl ₃ ·6H ₂ O	Riedel – de Hansën	P.A.
Cloruro de magnesio hexahidratado	MgCl ₂ ·6H ₂ O	Riedel – de Hansën	≥ 99.9%
Cloruro de calcio dihidratado	CaCl ₂ ·2H ₂ O	Merck	≥ 99.9%
Nitrato de mercurio (II)	Hg(NO ₃) ₂	Sigma - Aldrich	P.A.
Ácido etilendiaminotetraacético	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈	Riedel – de Hansën	P.A.
Nitrato de sodio	NaNO ₃	Merck	P.A.
Nitrito de sodio	NaNO ₂	Scharlau	P.A.
Cloruro de estroncio hexahidratado	SrCl ₂ ·6H ₂ O	Merck	P.A.

Para la preparación de las soluciones y ensayos se utilizó agua de grado Milli-Q que fue extraída de un sistema conformado por ósmosis inversa y filtración mediante filtro de fibra hueca con tamaño de poro 0.2 μm .

4.1.2 Equipos

Los equipos utilizados en la caracterización de las AuNPs y los estudios de detección de CN^- se listan a continuación.

- **Espectrofotómetro UV-Visible Agilent 8453.** Cuenta con dos lámparas como fuentes de luz, la primera de ellas es la de deuterio que emite luz entre 190 a 800 nm, rango ultravioleta. La segunda es la lámpara de wolframio que emite luz entre 370 a 1100 nm, rango visible. Sistema óptico de haz simple y detector de arreglo de diodos.
- **Espectrofluorímetro Perkin Elmer LS 55.** 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.
- **Espectrómetro i-Raman plus 785H BWTEK.** Con láser de diodos centrado a 785 nm y una potencia continua menor 300 mW con conectores de fibra óptica FC/PC. El sistema se encuentra acoplado a un soporte para muestras de cubetas modelo BCR100A 9.5 mm de BWTEK.
- **Miniespectrómetro Ocean Optics USB2000.** Cuenta con un puntero láser como fuente de excitación ($\lambda=532$ nm). El rango de detección es 177 – 800 nm.
- **Microscopio de fuerza atómica 3100 Digital Instruments.** Para realizar las mediciones se utilizó el modo de contacto intermitente empleando una punta de tungsteno.
- **Incubadora Heratherm IGS60**
- **Centrífuga Sigma 1-16**
- **Agitador Vortex MVOR 03**

4.2 Metodologías

4.2.1 Síntesis de AuNPs

La síntesis de AuNPs se realizó siguiendo el método de Turkevich-Frens^{32,33}. En primer lugar se agregaron 508 μL de una dilución 1:10 preparada a partir de una solución de HAuCl_4 (0.5 M) a 24 mL de agua ultrapura, se colocó la mezcla en un balón acoplado a un refrigerante y se llevó la solución a ebullición. A continuación, se agregó 1 mL de una solución acuosa de citrato de sodio (Na_3Ct) de 102 mM. La mezcla se dejó reaccionar por un tiempo de 30 minutos en agitación constante hasta observar la formación de un producto final rojo intenso. El esquema de síntesis de muestra en la Figura 10.

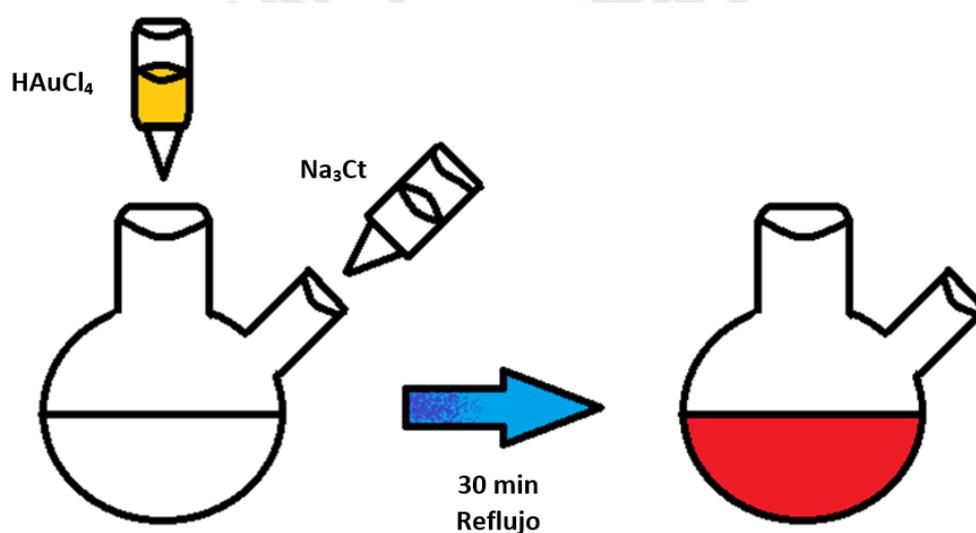


Figura 10. Esquema de síntesis para las AuNPs basada en el método de Turkevich-Frens.

4.2.2 Caracterización de AuNPs mediante espectroscopía UV-Visible

La caracterización de las nanopartículas se realizó en base a la longitud de onda que corresponde al máximo de extinción de la banda LSPR, gracias a ello se logró determinar el tamaño aproximado y la concentración de las AuNPs.

Experimentalmente, el proceso consistió en hacer una dilución 3:13 de las AuNPs obtenidas mediante la síntesis con agua ultrapura para luego medir el espectro en el UV-Visible Agilent 8453 en el rango 400 – 800 nm.

4.2.3 Caracterización de AuNPs mediante AFM

La caracterización por AFM se llevó a cabo en el Instituto de Fotónica de Leibniz (IPHT) ubicado en la ciudad de Jena (Alemania). En primer lugar, un substrato de vidrio fue modificado con APTES para asegurar la buena deposición de las AuNPs. La solución de AuNPs se diluyó en agua ultrapura en una proporción de 1:5, de la cual se tomaron 20 μL para depositarlos en el substrato de vidrio modificado. Una vez secos los *chips* se realizó la medición en el equipo AFM Dimensions 3100 de la marca Digital Instruments utilizando una punta triangular de tungsteno siguiendo la metodología de contacto intermitente

4.2.4 Funcionalización de AuNPs con rodamina B

Para obtener el sensor (AuNPs–RB) se llevó a cabo la funcionalización de AuNPs con el fluoróforo rodamina B mediante dos métodos. El protocolo inicial, está basado en la metodología diseñada por Shang y col.¹; mientras que el segundo ha sido propuesto en el presente trabajo mediante los experimentos realizados a lo largo del estudio de funcionalización de las AuNPs.

4.2.4.1 Protocolo de funcionalización inicial

En primer lugar, se añadieron 1.2 mL de AuNPs a un tubo de centrífuga de 15 mL para obtener una concentración final de nanopartículas de 1 nM. A continuación, se adicionaron 5 mL de buffer $\text{Na}_2\text{CO}_3\cdot\text{NaHCO}_3$ (pH = 10) cuya concentración final en el ensayo fue de 10 mM. Posteriormente, a partir de una solución patrón de RB, se tomaron alícuotas de 250-750 μL para obtener concentraciones finales de 50-150 nM de RB. El volumen final de 15 mL se completó con agua ultrapura y el sensor se mantuvo bajo agitación constante durante 30 minutos. Los espectros de emisión fueron monitoreados cada 10 minutos en el rango de 535 – 700 nm ($\lambda_{\text{excitación}}$ 520 nm) por 30 min.

4.2.4.2 Protocolo de funcionalización propuesto

Este protocolo es una variación del protocolo inicial en el que se han realizado algunas modificaciones como mantener constantes el volumen y temperatura de la funcionalización para asegurar una mejor reproducibilidad durante los ensayos. Se eliminó la solución buffer durante la funcionalización y se aumentaron las concentraciones finales de AuNPs (3 nM) y RB (900 nM).

Por tanto, la metodología consistió en colocar en un tubo de centrifuga de 15 mL, 1.2 mL de AuNPs para obtener una concentración final de 3 nM. A continuación, a partir de una solución patrón de RB, se tomó una alícuota de 180 μL para obtener una concentración final de 900 nM. El volumen final de 6 mL se completó con agua ultrapura y el sensor se mantuvo bajo agitación constante dentro de la incubadora a 30°C durante 30 minutos.

También se estudió la posibilidad de eliminar el exceso de rodamina B por medio de la centrifugación. Se colocó 1 mL de sensor en cada uno de 6 tubos Eppendorf de 1.5 mL, los cuales fueron centrifugados a 8000 rpm por 30 minutos. Al terminar el proceso de centrifugación, se retiró el sobrenadante y se resuspendió las nanopartículas ya funcionalizadas en 900 μL de agua ultrapura. Finalmente el sensor se recolectó en otro tubo falcon de 15 mL.

4.2.5 Detección de cianuro

Para llevar a cabo la detección de cianuro con el sensor AuNPs-RB se utilizaron dos protocolos, el primero de ellos está basado, nuevamente, en la metodología propuesta por Shang y col.¹, mientras que el segundo ha sido propuesto en el presente trabajo gracias a los experimentos realizados durante la investigación.

4.2.5.1 Protocolo de detección inicial

Este protocolo está basado en el ensayo propuesto por Shang y col¹. En primer lugar, se preparó una solución stock de KCN de 25 mM a partir de la cual se realizaron las diluciones adecuadas para cada patrón. Luego, en un microtubo de 1.5 mL se agregaron 900 μL de sensor y 100 μL del patrón correspondiente. Finalmente, la mezcla se dejó reaccionar 40 minutos. Los espectros de excitación se obtuvieron en el rango de 515 – 565 nm con un $\lambda_{\text{emisión}} = 580$ nm. Las intensidades de emisión reportadas corresponden al $\lambda_{\text{excitación}} = 520$ nm.

4.2.5.2 Protocolo de detección propuesto

Este protocolo es una variación del protocolo inicial en el que se han realizado algunas modificaciones como el tiempo de la reacción y la adición de NaOH 0.1 M a los patrones de KCN para evitar su rápida degradación. En primer lugar, se preparó una solución stock de KCN de 25 mM a partir de la cual se realizaron las diluciones adecuadas para cada patrón. Luego en un tubo

ependorf de 1.5 mL se agregaron 100 μL de buffer $\text{Na}_2\text{CO}_3\cdot\text{NaHCO}_3$ ($\text{pH} = 10$) para una concentración final de 10 mM, 440 μL de agua ultrapura, 450 μL de sensor y 10 μL del patrón correspondiente. Finalmente, se dejó reaccionar durante 20 minutos. Los espectros de excitación se obtuvieron en el rango de 515 – 565 nm con un $\lambda_{\text{emisión}} = 580$ nm. Las intensidades de emisión reportadas corresponden al $\lambda_{\text{excitación}} = 520$ nm.

4.2.5.3 Optimización del protocolo de detección propuesto

Este protocolo es una optimización del protocolo propuesto en el que se han modificado algunos parámetros como cantidad de sensor agregado y el orden en el que se agregan los reactivos durante la reacción.

En primer lugar, se preparó una solución stock de KCN de 25 mM a partir de la cual se realizaron las diluciones adecuadas para cada patrón cuyo rango de concentraciones va de 0 – 200 μM . Luego en un microtubo de 1.5 mL se agregó en el siguiente orden: 100 μL de buffer $\text{Na}_2\text{CO}_3\cdot\text{NaHCO}_3$ ($\text{pH} = 10$) para una concentración final de 10 mM, 340 μL de agua ultrapura, 100 μL de EDTA para una concentración final de 3 mM, 450 μL de sensor y 10 μL del patrón de KCN correspondiente disuelto en NaOH 0.1 M. Finalmente, se dejó reaccionar 20 minutos y se procedió a registrar las mediciones empleando los espectros de excitación que se obtuvieron en el rango de 515 – 565 nm con un $\lambda_{\text{emisión}} = 580$ nm. Las intensidades de emisión reportadas corresponden al $\lambda_{\text{excitación}} = 520$ nm.

4.2.6 Estudio de interferentes

Una vez establecido el protocolo propuesto y habiendo optimizado el proceso, se desarrolló el protocolo para el estudio de interferentes. Los cationes y aniones seleccionados para realizar este estudio fueron obtenidos a partir de diferentes sales: Na_2SO_4 , $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, NaF, KCl, $\text{FeSO}_4\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$, NaNO_3 , NaNO_2 y $\text{SrCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

Se preparó una solución stock de KCN de 25 mM a partir de la cual se realizó una dilución adecuada para obtener el patrón KCN correspondiente cuya concentración final en el ensayo fue de 100 μM . Luego, en un microtubo de 1.5 mL se agregó en el siguiente orden: 100 μL de buffer $\text{Na}_2\text{CO}_3\cdot\text{NaHCO}_3$ ($\text{pH} = 10$) para una concentración final de 10 mM, 240 μL de agua ultrapura, 100 μL de interferente (sales especificadas en el párrafo anterior cuya concentración final

en el ensayo fue de 500 μM), 100 μL de EDTA 30 mM para una concentración final de 3 mM, 450 μL de sensor y 10 μL del patrón de KCN correspondiente disuelto en NaOH 0.1 M. Finalmente se dejó reaccionar 20 minutos y se procedió a registrar las mediciones empleando los espectros de excitación que se obtuvieron en el rango de 515 – 565 nm con un $\lambda_{\text{emisión}} = 580$ nm. Las intensidades de emisión reportadas corresponden al $\lambda_{\text{excitación}} = 520$ nm.

4.2.7 Mediciones en el equipo portátil

Se implementó un espectrómetro de fluorescencia portátil para monitorear el sensor. El dispositivo consistió de un puntero láser como fuente de excitación ($\lambda=532$ nm), un portacubeta hecho a la medida y un miniespectrómetro (USB2000, Ocean Optics) para medir la fluorescencia a 90° del haz de excitación. Se empleó un filtro eliminador de banda (*notch filter*; Edmund Optics #67-110, OD 4 para $\lambda=532$ nm) para atenuar la luz láser que llegara al espectrómetro. Un esquema del dispositivo se muestra en la Figura 11.

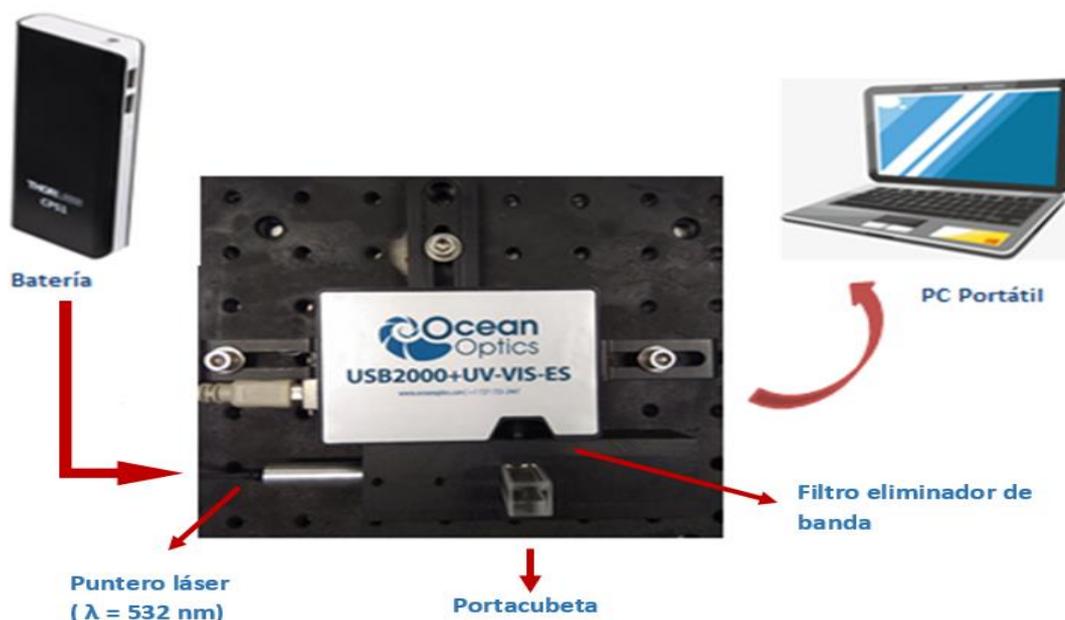


Figura 11. Esquema del espectrómetro de fluorescencia portátil que consta de un láser, miniespectrómetro, portacubetas y software para los ensayos de portabilidad y muestras reales.

Se realizaron las curvas de calibración siguiendo el método 4.2.5.3 pero haciendo las mediciones en el equipo portátil ($\lambda_{\text{excitación}} = 520 \text{ nm}$) en vez de en el espectrofluorímetro.

4.2.8 Análisis de muestras reales

Se probaron tres muestras reales diferentes: agua de caño colectada del laboratorio de Análisis Instrumental de la PUCP, agua mineral San Mateo (comercial) y agua del río Santa Eulalia recolectada el 6 de noviembre del 2017. El agua de río se filtró previamente con un filtro de jeringa de Nylon (tamaño de poro $0.45 \mu\text{m}$).

Inicialmente, se preparó una solución stock de KCN de 25 mM a partir de la cual se realizó una dilución adecuada para obtener el patrón KCN correspondiente cuya concentración final en el ensayo fue de $100 \mu\text{M}$. Luego, en un microtubo de 1.5 mL se agregó en el siguiente orden: $100 \mu\text{L}$ de buffer $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{NaHCO}_3$ ($\text{pH} = 10$) para una concentración final de 10 mM, $340 \mu\text{L}$ de la muestra de agua (especificadas en el párrafo anterior), $100 \mu\text{L}$ de EDTA 30 mM para una concentración final de 3 mM, $450 \mu\text{L}$ de sensor y $10 \mu\text{L}$ del patrón de KCN correspondiente disuelto en NaOH 0.1 M. Se realizó el ensayo por triplicado. Finalmente se dejó reaccionar 20 minutos y se procedió a registrar las mediciones empleando los espectros de excitación que se obtuvieron en el rango de 515 – 565 nm con un $\lambda_{\text{emisión}} = 580 \text{ nm}$. Las intensidades de emisión reportadas corresponden al $\lambda_{\text{excitación}} = 520 \text{ nm}$.

4.2.9 Análisis del sensor mediante espectroscopía Raman

Se homogenizó una mezcla de AuNPs (4 nM) y RB ($50 \mu\text{M}$), se colocó en una celda de vidrio y se registró su espectro Raman (láser 785 nm, potencia de láser de 100%, 25 adquisiciones en promedio y 7 s de tiempo de integración en el espectrómetro i-Raman plus 785H).

Los ensayos con cianuro se efectuaron agregando una cantidad adecuada de KCN en NaOH (0.1 M) al sensor preparado previamente, para obtener una concentración final en el ensayo de $50 \mu\text{M}$. El procedimiento fue repetido una vez más cambiando la concentración final de cianuro a $5 \mu\text{M}$ con los mismos parámetros seleccionados anteriormente.

4.3 Resultados Experimentales

4.3.1 Síntesis y caracterización de AuNPs por espectroscopía UV-Vis

Las AuNPs se caracterizaron según el protocolo 4.2.2. La longitud de onda del máximo de la banda LSPR obtenido ($\lambda_{\text{máx}}=519 \text{ nm}$) corresponde a AuNPs con un diámetro promedio de 14 nm. Se empleó el coeficiente de extinción reportado en la literatura ($\epsilon_{450} = 1.76 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)² para AuNPs de este tamaño. La Figura 12 muestra el espectro UV-Visible de estas AuNPs.

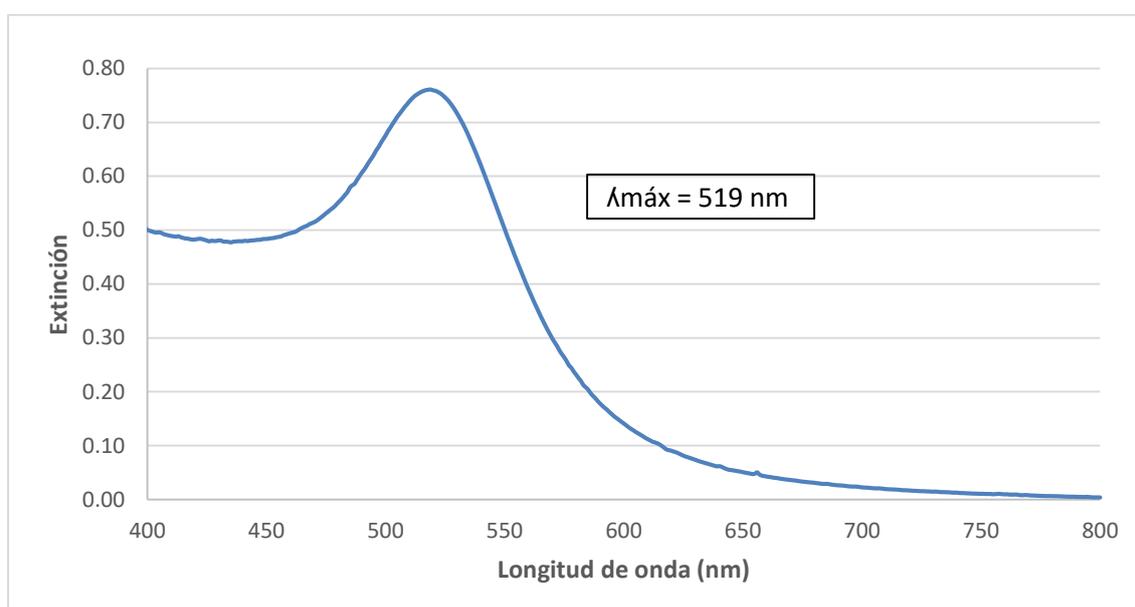


Figura 12. Espectro de extinción de las AuNPs obtenidas mediante el método de Turkevich-Frens.

4.3.2 Caracterización de AuNPs por microscopía de fuerza atómica

A continuación, en la figura 13 se muestran la micrografía (13a) y el gráfico de distribuciones de tamaño (13b) obtenidos siguiendo el protocolo 4.2.3. El tamaño promedio fue de 14 ± 2 nm.

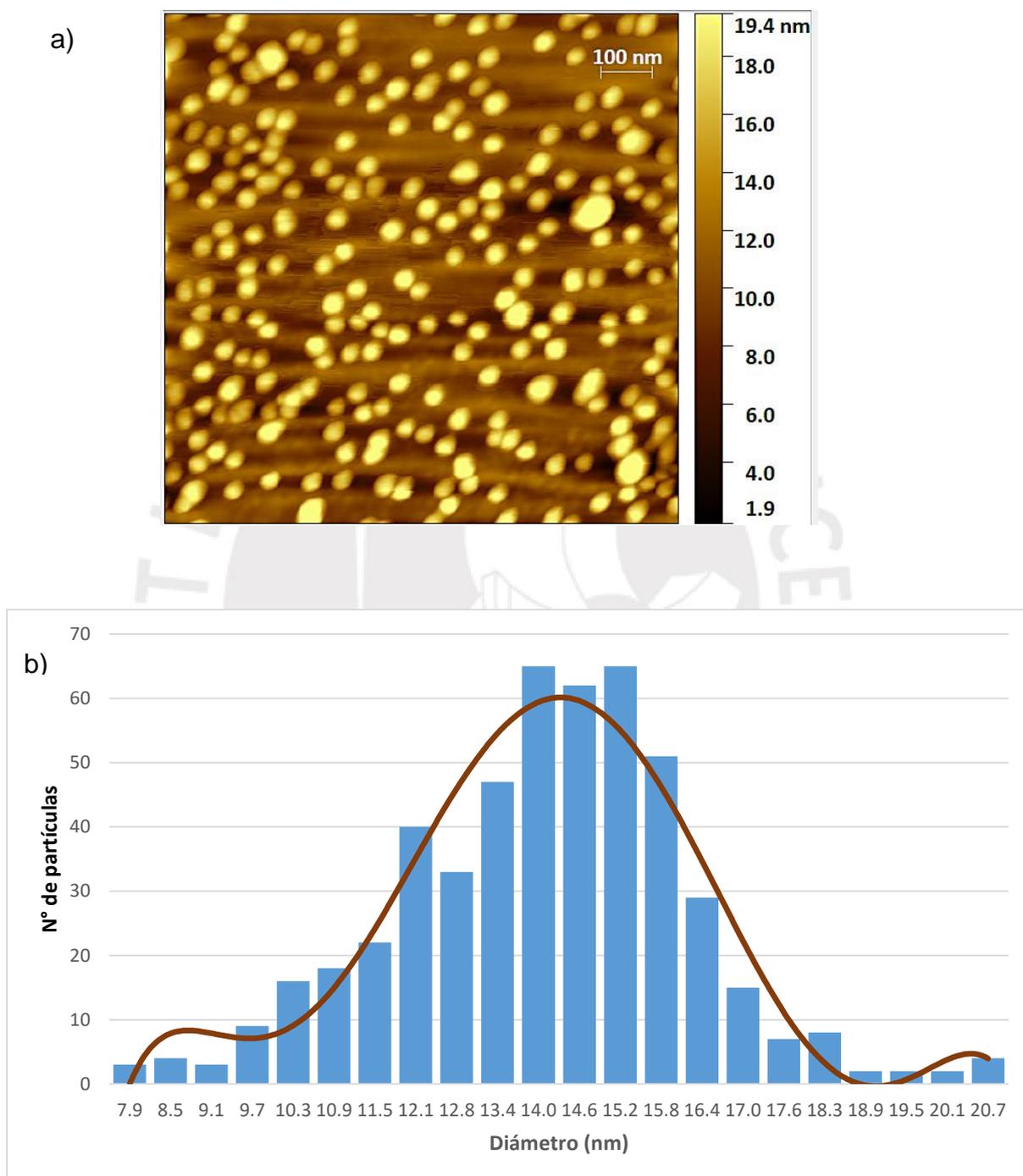


Figura 13. Caracterización de las AuNPs mediante AFM a) Micrografía AFM de las AuNPs sintetizadas. b) Gráfico de distribución de tamaños obtenido para 500 nanopartículas de oro.

4.3.3 Estudio de AuNPs, RB y cianuro mediante espectroscopia UV-Vis

La interacción entre los componentes del sensor fue estudiada por medio de la espectroscopia de UV-Vis. Para esto, se preparó un sensor siguiendo el protocolo de funcionalización propuesto en la sección 4.2.4.2 y se efectuaron los ensayos de detección de cianuro siguiendo el protocolo de detección de la sección 4.2.5.2 con la diferencia que la detección se monitoreó mediante espectroscopia UV-Vis.

La figura 14a muestra los resultados obtenidos para este estudio, en el cual se observa que existe un desplazamiento de la banda LSPR determinado por el aumento de la concentración de KCN de 0 a 200 μM . La figura 14b muestra una tendencia lineal en la disminución de absorbancia en el rango de 0 a 50 μM .

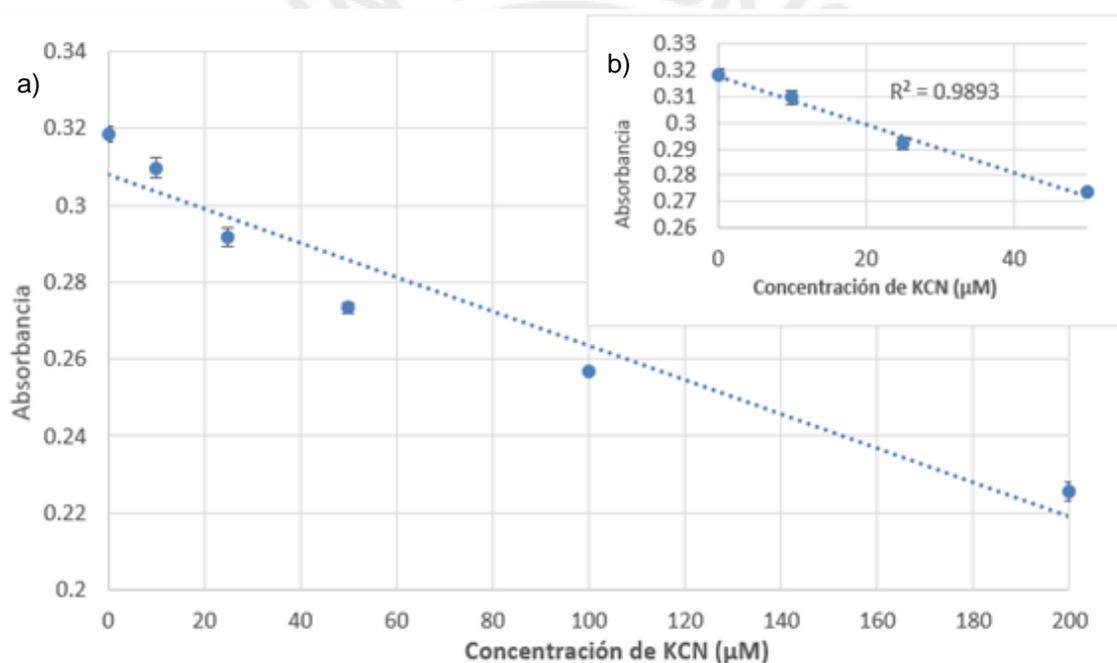


Figura 14. Absorbancia del sensor en función de la concentración de KCN en el rango de a) 0 – 200 μM y b) 0 – 50 μM .

4.3.4 Estudio de AuNPs, RB y cianuro mediante espectroscopía

Raman

La interacción entre los componentes del sensor fue estudiada también por medio de la espectroscopía Raman, siguiendo las condiciones experimentales indicadas en la sección 4.2.9.

La figura 15 muestra los resultados obtenidos en los ensayos de detección de cianuro. Las señales características de la RB debido al estiramiento de los carbonos aromáticos C=C (1652 , 1510 y 1361 cm^{-1}), los enlaces C-H (1533 cm^{-1}) y el enlace C-O-C (1282 cm^{-1}) son fácilmente observables en presencia de AuNPs⁷¹. Sin embargo, la intensidad de los picos decae al entrar en contacto con el anión. En presencia de cianuro, se observó la aparición de la señal correspondiente al estiramiento del enlace C \equiv N, que se encuentra alrededor de 2154 cm^{-1} .⁷² Se observó que el sensor detectó claramente una concentración de cianuro cercana a 50 μM , mientras que al bajar la concentración de cianuro a 5 μM , la señal era casi imperceptible.

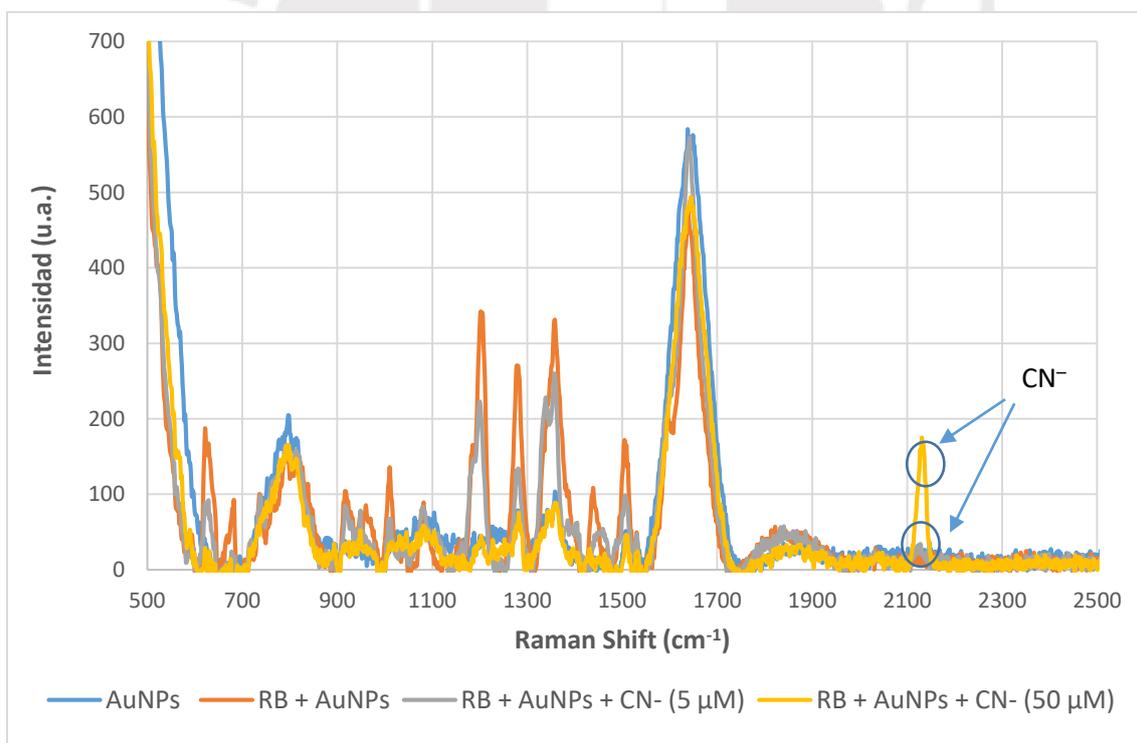


Figura 15. Espectros Raman para el sensor de RB (50 μM) y AuNPs (4 nM) y su respuesta frente a diferentes concentraciones de CN⁻.

4.3.5 Estudio de AuNPs, RB y cianuro mediante fluorescencia

Una vez obtenidas las AuNPs, el siguiente paso fue la funcionalización con rodamina B, luego de lo cual se añadió el CN^- para su detección por medio de la fluorescencia. Para estudiar la interacción entre todos los reactivos se realizó un ensayo previo cuyas condiciones se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Concentraciones de AuNPs, RB, CN^- y buffer utilizadas para el ensayo entre los reactivos.

Concentración de AuNPs (nM)	Concentración de RB (nM)	Concentración de CN^- (μM)	Concentración de Buffer (mM) (pH=10)
1	150	10	10

La funcionalización de la AuNPs con rodamina B se realizó siguiendo el protocolo inicial de funcionalización descrito en la sección 4.2.4.1 y empleando 150 nM de RB. Una vez finalizada la funcionalización se llevó a cabo la reacción con CN^- siguiendo el protocolo de detección 4.2.5.1. Los espectros de fluorescencia obtenidos se muestran a continuación en la figura 16.

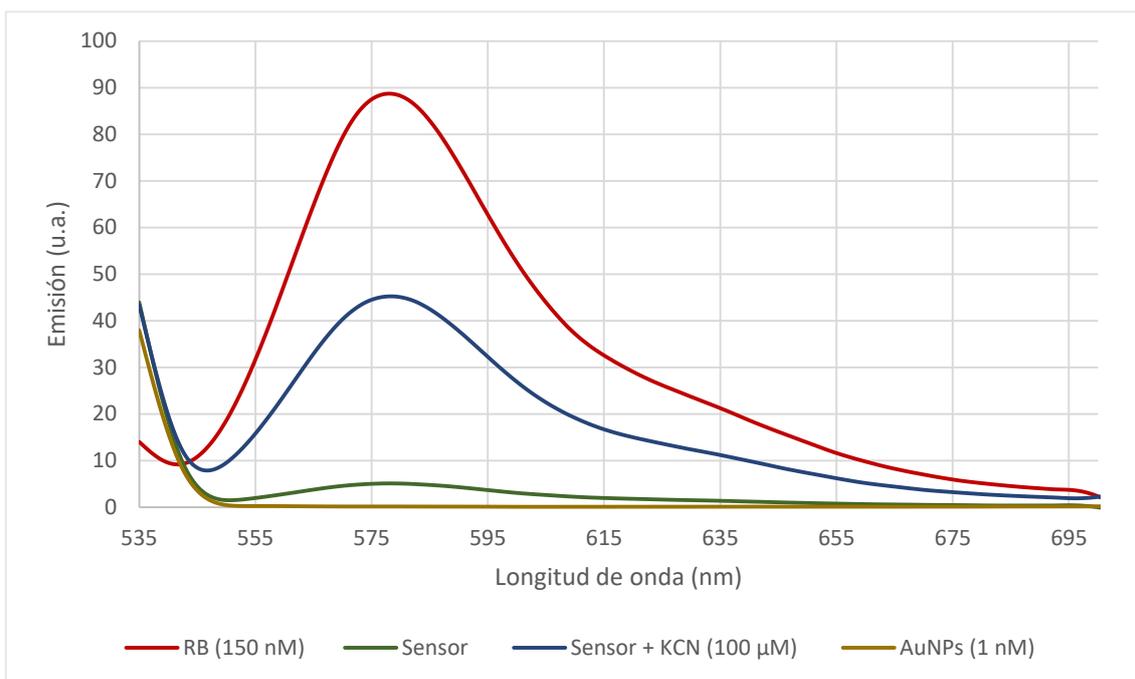


Figura 16. Curvas de fluorescencia para el sensor de 150 nM RB y AuNPs 1 nM. Finalizada la funcionalización se realizó la prueba del sensor con KCN 100 µM ($\lambda_{\text{excitación}} = 520 \text{ nm}$).

Se puede observar que las AuNPs inhiben de manera efectiva la fluorescencia característica de la RB. Sin embargo, aún se observa una ligera fluorescencia probablemente debido a que la cantidad de RB añadida es excesiva para la concentración de AuNPs con la que se realizaron los experimentos. Además, el sensor responde a la presencia de cianuro aunque se debe tomar en consideración que estas pruebas son preliminares y que posteriormente se efectuarán algunas optimizaciones que permitan detectar concentraciones menores de este anión.

4.3.5.1 Efecto de la presencia de buffer durante la funcionalización

Para estudiar el efecto del buffer en la funcionalización de las AuNPs se decidió preparar dos sensores, uno de ellos contenía buffer mientras que el otro sólo agua ultrapura. El protocolo seguido para la funcionalización y detección de cianuro fueron los especificados en la sección 4.2.4.1 y 4.2.5.1. Las mediciones se realizaron por triplicado y las condiciones del ensayo se muestran en la tabla 3.

Al comparar ambas mediciones mostradas en la figura 17, se observó que la relación entre la intensidad fluorescente del sensor sin cianuro y con cianuro (F/F_0) para el ensayo sin buffer era de 9.6 mientras que la del ensayo con buffer era de apenas 2.5. Por esta razón, se decidió realizar los experimentos posteriores sin buffer durante la funcionalización.

Tabla 3. Ensayos realizados para observar el efecto del buffer en la detección de KCN.

Experimento	Concentración de AuNPs (nM)	Concentración de RB (nM)	Concentración de CN^- (μM)	Concentración de Buffer (mM) (pH=10)
1 (CB)	1	150	100	10
2 (SB)	1	150	100	-

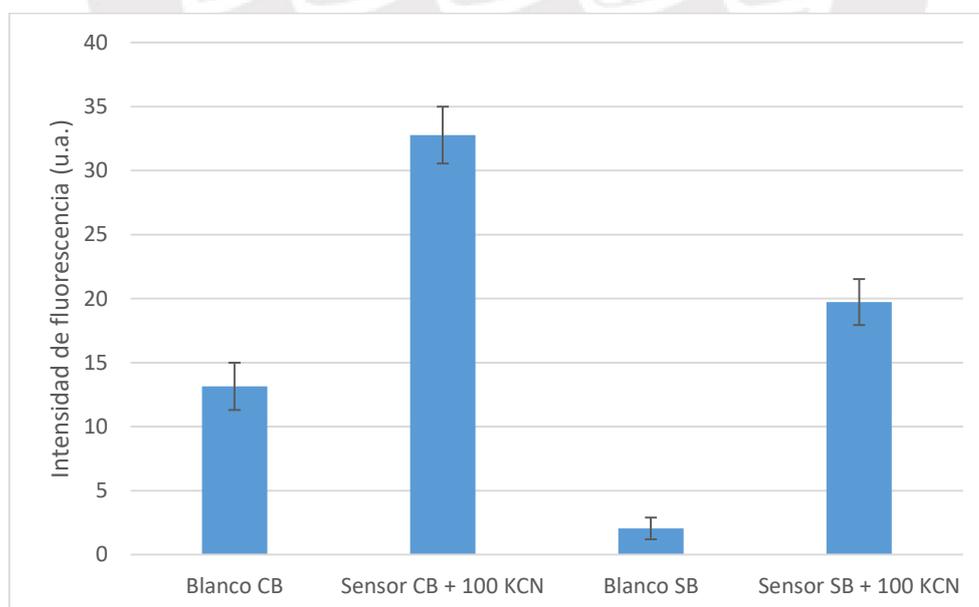


Figura 17. Comparación de intensidad de fluorescencia en respuesta a la presencia de cianuro entre un sensor con buffer (CB) y sin buffer (SB) en la funcionalización.

4.3.5.2 Prueba de distintas concentraciones de rodamina B

Para determinar las concentraciones de partida adecuadas para la RB, se realizaron algunos experimentos siguiendo el protocolo inicial (sección 4.2.4.1) en donde se fijaron dos concentraciones de AuNPs (1 y 3 nM) y se fue variando la concentración de RB. Los resultados se muestran en la figura 18. Se realizó una única medición para cada concentración de RB.

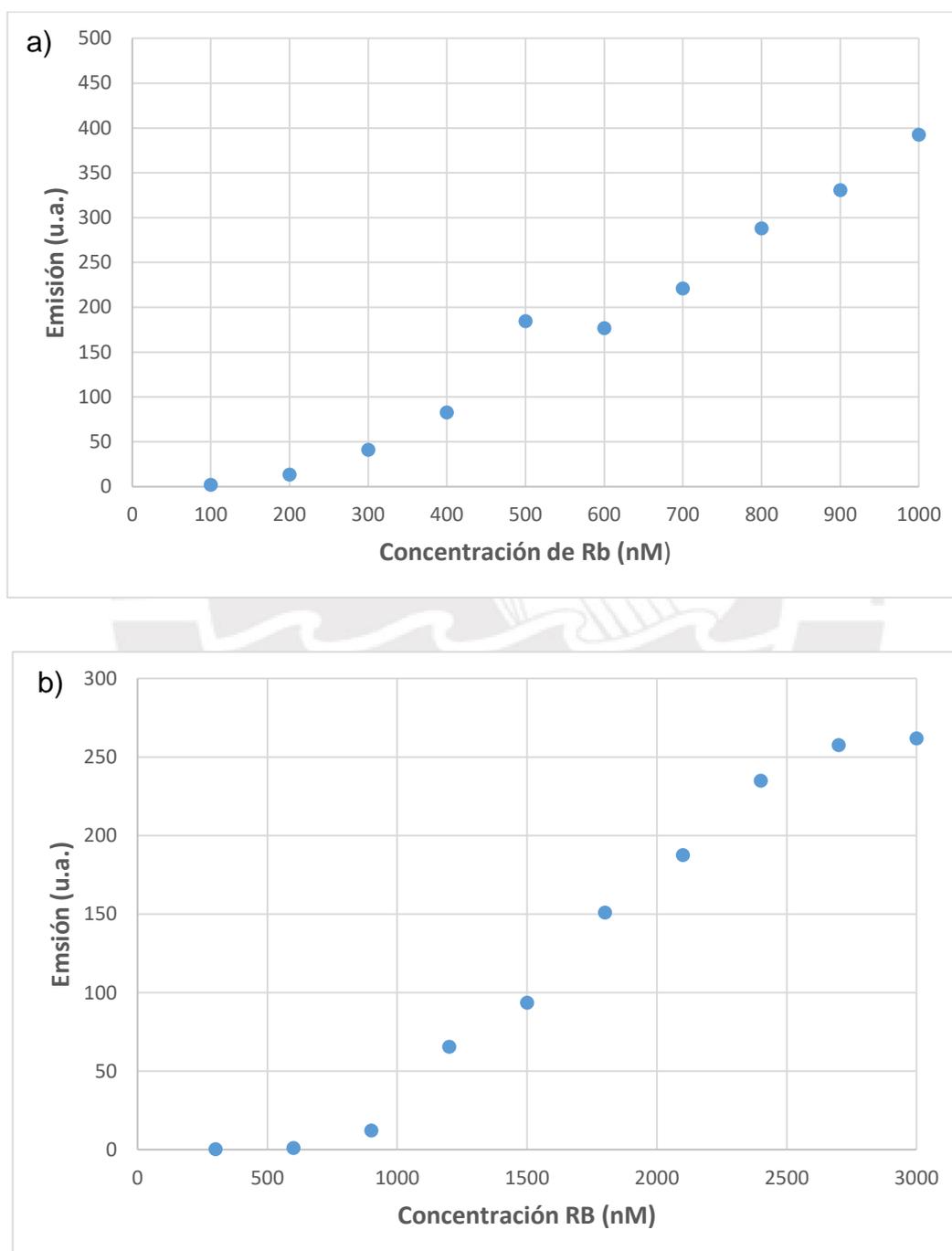


Figura 18. Intensidad de fluorescencia de diferentes concentraciones de RB en presencia de AuNPs a) 1 nM y b) 3 nM.

En la figura 18a se observó claramente que si la concentración de RB es mayor a 200 nM la fluorescencia no es completamente inhibida por las AuNPs de concentración 1 nM, por lo que el rango de trabajo se limita a concentraciones menores de 200 nM. Se realizó también un experimento similar con sensores que contenían una concentración final de AuNPs de 3 nM. Los resultados mostrados en la figura 18b indican que las AuNPs podían inhibir casi por completo concentraciones de RB de hasta 900 nM. Esta condición de funcionalización implicaba una mayor adsorción del fluoróforo sobre las nanopartículas y un sensor más concentrado que provee mayor versatilidad para variaciones de volúmenes en el ensayo. Es por esta razón que se empleó la concentración de nanopartículas de 3 nM para los ensayos siguientes.

4.3.5.3 Pruebas preliminares con cianuro

Teniendo en cuenta los resultados anteriores se decidió trabajar, en primer lugar, con el sensor de 3 nM AuNPs y 600 nM de RB. El sensor fue preparado siguiendo el protocolo propuesto de la sección 4.2.4.2. Se evaluaron dos casos en los que la concentración de rodamina en la funcionalización era de 600 y 900 nM.

Los ensayos con KCN fueron realizados en base al protocolo inicial de la sección 4.2.5.1, haciendo 3 variaciones en cuanto al volumen de sensor agregado para los ensayos (900, 450 y 300 μ L). La figura 19 muestra los resultados obtenidos para estos experimentos.

Dada la buena respuesta del sensor de 3 nM AuNPs y 600 nM RB frente al CN^- (100 μ M) se decidió probar otro sensor con una concentración de RB de 900 nM a fin de comparar sus respuestas en la detección de cianuro y encontrar la concentración de rodamina óptima.

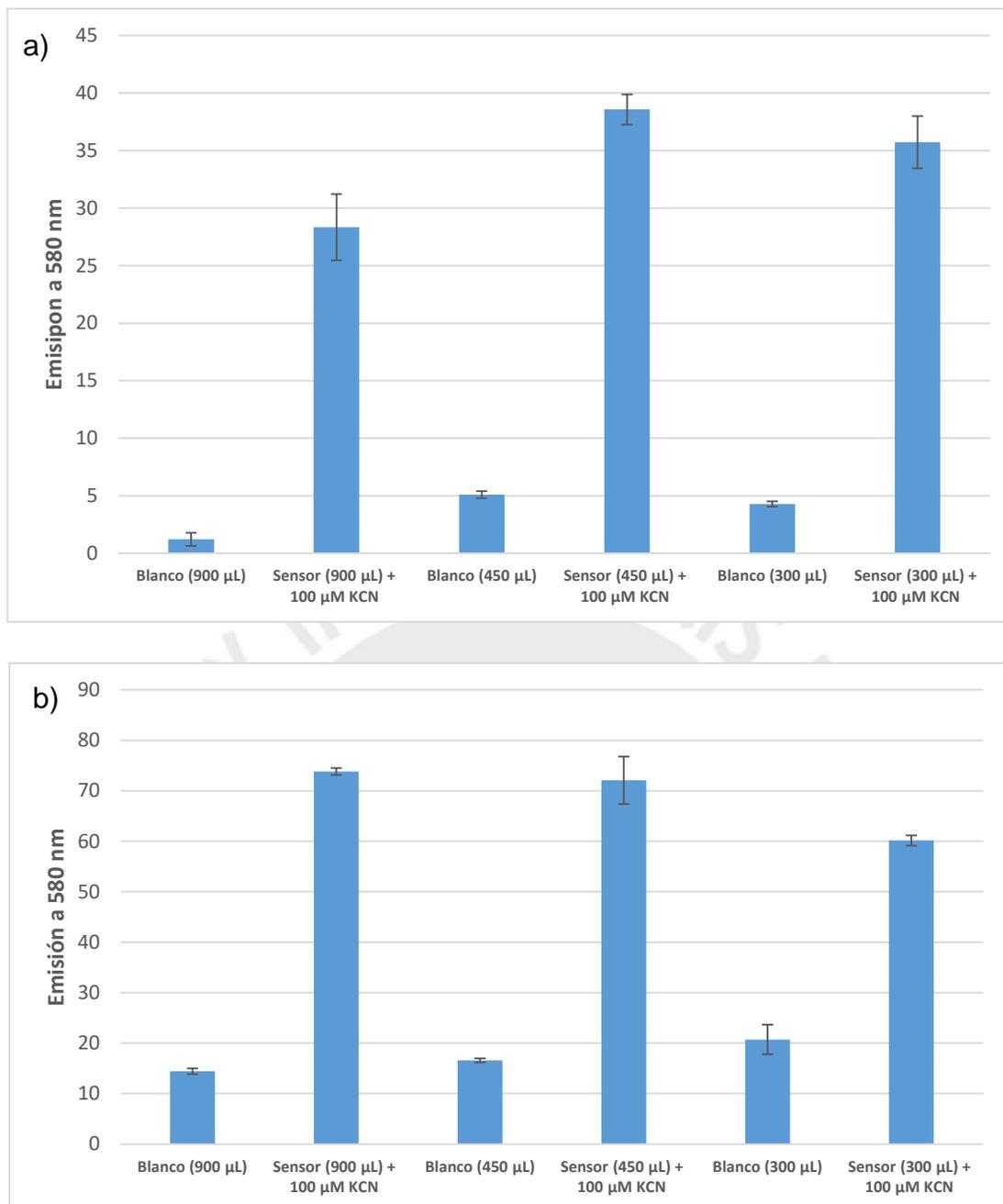


Figura 19. Efecto del volumen del sensor a) 3 nM AuNPs y 600 nM RB y b) 3 nM AuNPs y 900 nM RB frente a una concentración de CN^- de 100 μM .

Las figura 19 permitió diferenciar las respuestas de los dos sensores al utilizar volúmenes distintos de RB. En los dos casos se observó que para 450 y 900 μL la respuesta es mucho mayor en comparación al volumen de 300 μL en donde el blanco tiene mayor intensidad y error. Dependiendo de la cantidad de RB utilizada se observó también que ambos sensores, con 600 y 900 nM de RB presentaron una buena respuesta a la detección de cianuro.

Dado que las diferencias entre los volúmenes 450 y 900 μL para los dos sensores son pequeñas, se optó por utilizar el volumen de 450 μL pues permitió optimizar la cantidad de sensor requerida para cada ensayo. La figura 20 muestra la comparación de la respuesta de los dos sensores frente a una concentración de cianuro de 100 μM utilizando 450 μL de cada uno para los ensayos.

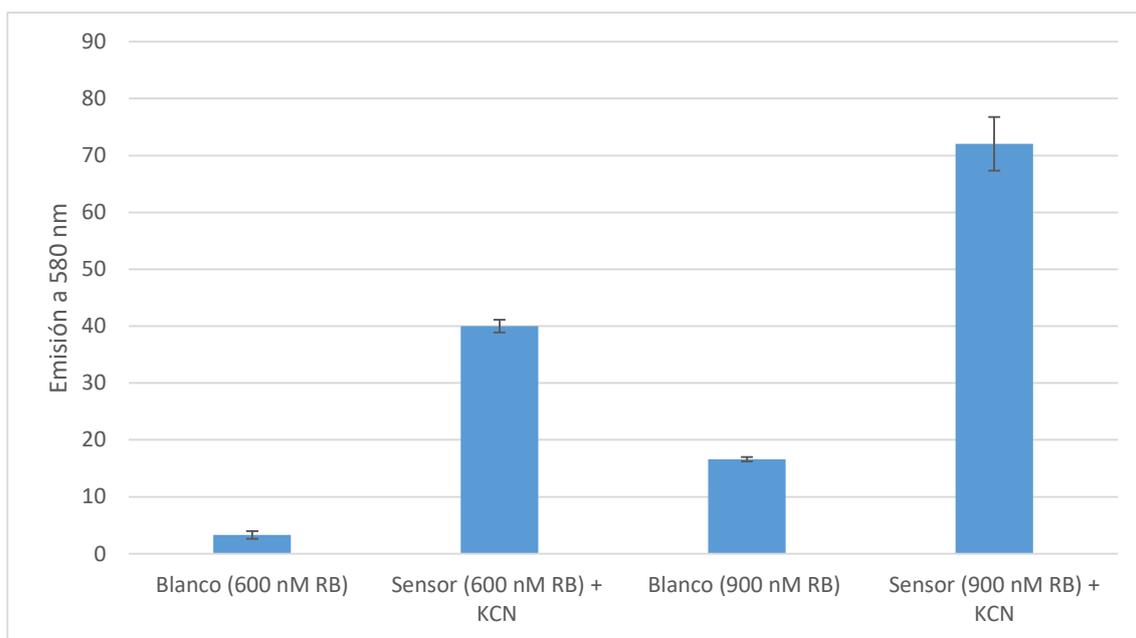


Figura 20. Respuesta de cada sensor (3 nM AuNPs + RB) frente a 100 μM KCN.

Al ver las buenas respuestas de los sensores que contenían 600 y 900 nM de RB, se efectuaron algunos ensayos preliminares para determinar el tiempo de reacción óptimo entre el sensor y el cianuro antes de llevar a cabo los primeros ensayos para las curvas de calibración.

4.3.5.4 Efecto del tiempo

Para optimizar el tiempo de reacción del sensor con el cianuro se realizaron ensayos con diferentes patrones de KCN (10, 25 y 100 μM) utilizando uno de los sensores estudiados previamente, el cual contenía 600 nM de RB siguiendo el protocolo establecido en la sección 4.2.5.1. La respuesta fue monitoreada a través del tiempo hasta que se mantuvo constante.

Los resultados, mostrados en la figura 21 indican que el tiempo óptimo fueron 20 min, a partir del cual ya no se observaron cambios notables.

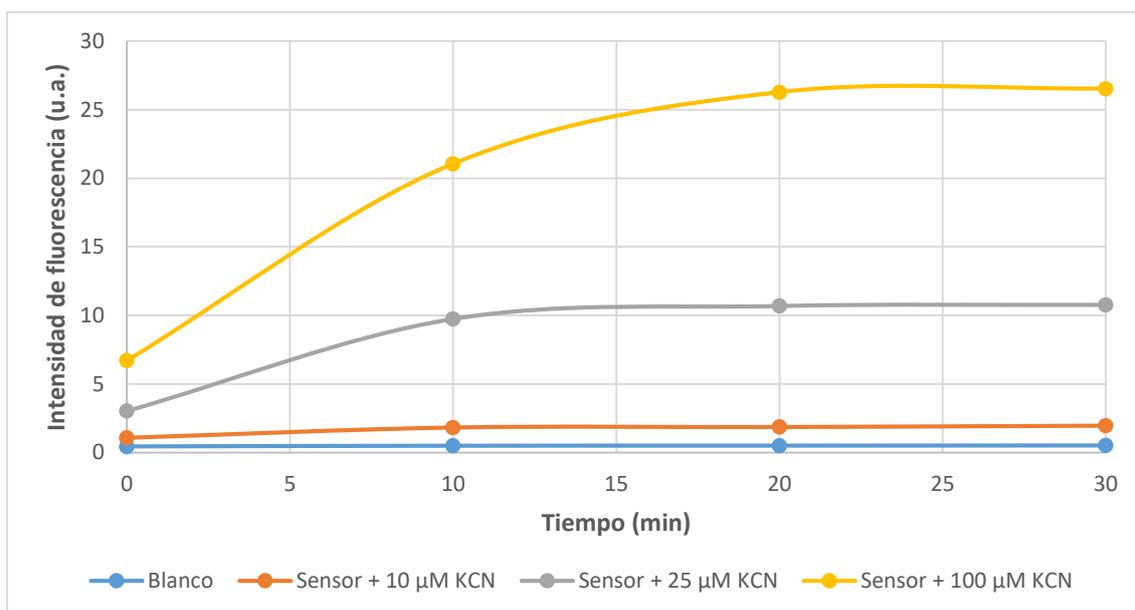


Figura 21. Gráficos de intensidad vs tiempo para cada concentración de KCN (10 μM , 25 μM y 100 μM) efectuados con el sensor de 3 nM AuNPs y 600 nM RB.

4.3.5.5 Curva de calibración para el sensor de 3 nM AuNPs y 600 nM RB

Para realizar la curva de calibración con este sensor, se realizó en primer lugar la funcionalización siguiendo el protocolo propuesto en la sección 4.2.4.2, mientras que la detección de cianuro siguió el protocolo de la sección 4.2.5.2. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 22.

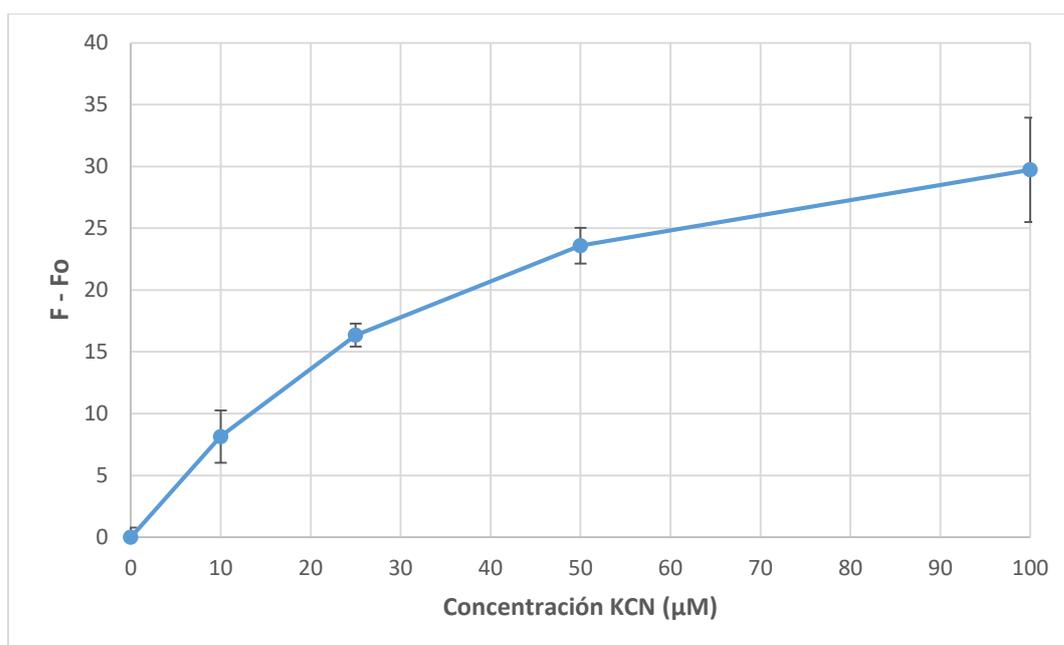


Figura 22. Curva de calibración correspondiente al sensor 3 nM AuNPs y 600 nM RB frente a diferentes concentraciones de KCN.

Para determinar el límite de detección de este sensor se realizó una nueva curva de calibración incluyendo patrones de KCN desde 2 hasta 25 μM . La figura 23 muestra los resultados obtenidos.

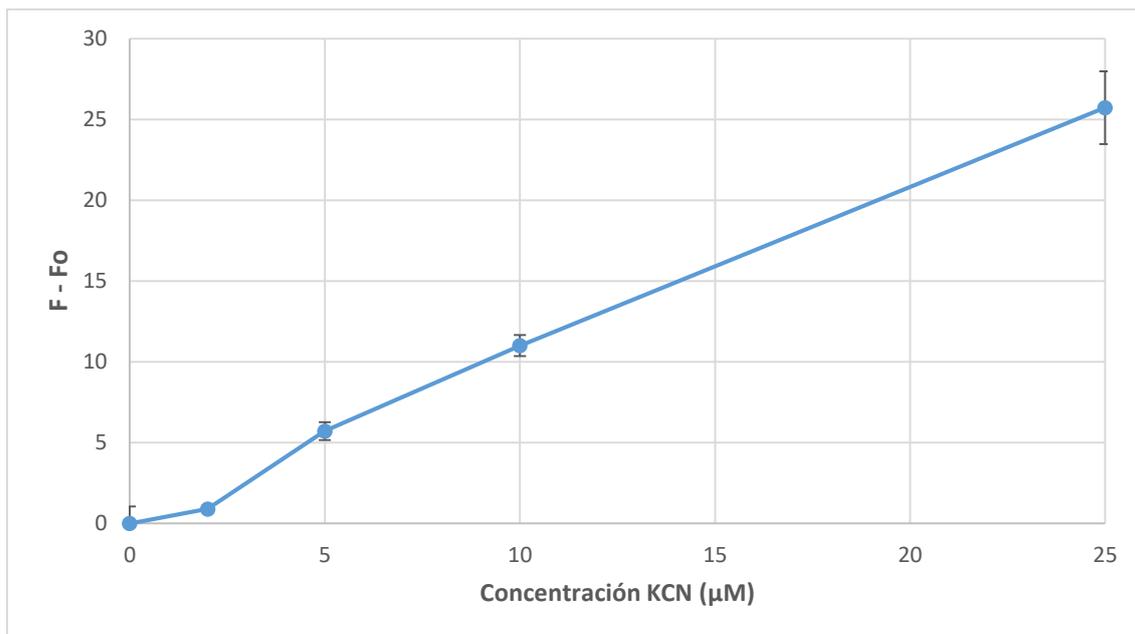


Figura 23. Curva de calibración del sensor de 3 nM AuNPs y 600 nM RB con patrones de KCN de 0 – 25 μM .

Como se observa en la figura anterior, no fue posible distinguir la presencia de cianuro con este sensor cuando la concentración fue menor a 5 μM . Por tal motivo, se decidió probar el sensor con 900 nM RB.

4.3.5.6 Curva de calibración para el sensor de 3 nM AuNPs y 900 nM RB

La curva de calibración para este sensor se realizó de la misma manera que la anterior, siguiendo los protocolos 4.2.4.2 y 4.2.5.2. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 24.

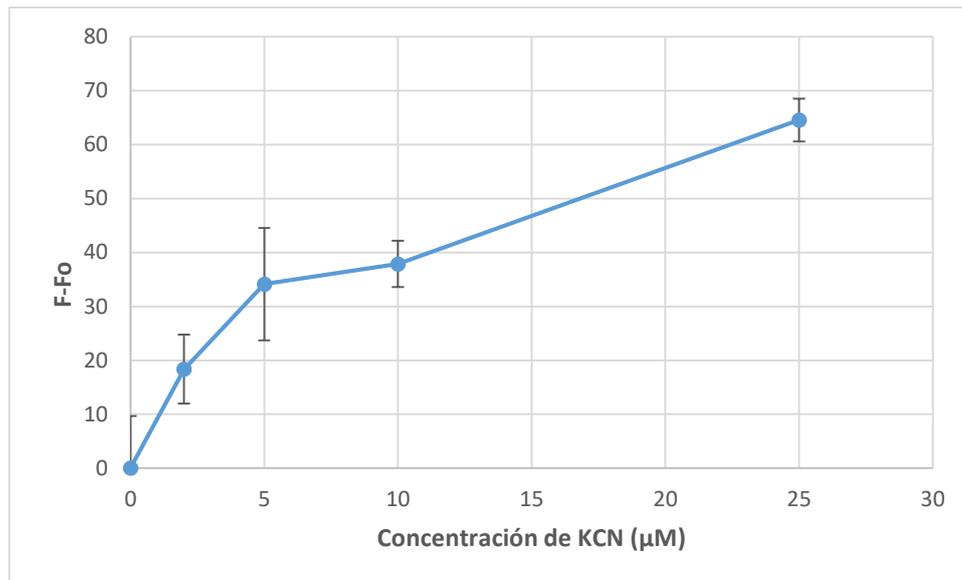


Figura 24. Primera curva de calibración para el sensor de 3 nM AuNPs y 900 nM RB con patrones de KCN de 0 – 25 μM KCN.

Como se muestra en la figura previa, los resultados de la curva de calibración presentan barras de error muy significativas. En la figura 20 se observó que el sensor de 3 nM AuNPs y 900 nM RB es el que da más señal; sin embargo, presenta una intensidad de fluorescencia muy alta debida al exceso de rodamina durante la funcionalización que no ha podido adherirse a la superficie de las nanopartículas. Este exceso puede fácilmente alterar las mediciones y dar como resultado mediciones poco precisas.

Para superar este problema, se planteó el uso de la centrifugación para retirar el exceso de rodamina presente en el ensayo. La funcionalización se llevó a cabo siguiendo el protocolo mencionado en la sección 4.2.4.2.

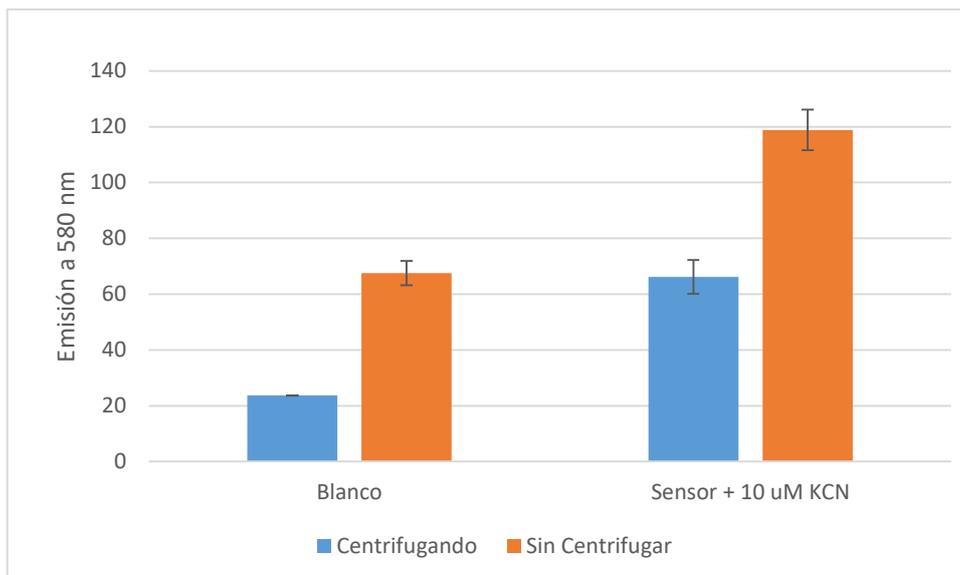


Figura 25. Emisión fluorescente del sensor con y sin centrifugación previa.

La figura 25 permitió observar una mejora en el proceso de detección de cianuro con el sensor de 3 nM AuNPs y 900 nM RB ya que las barras de error presentadas son más pequeñas y el exceso de RB se redujo considerablemente. Con esta metodología se decidió hacer una nueva curva de calibración para evaluar el límite de detección de este sensor. La curva obtenida se muestra, a continuación, en la figura 26.

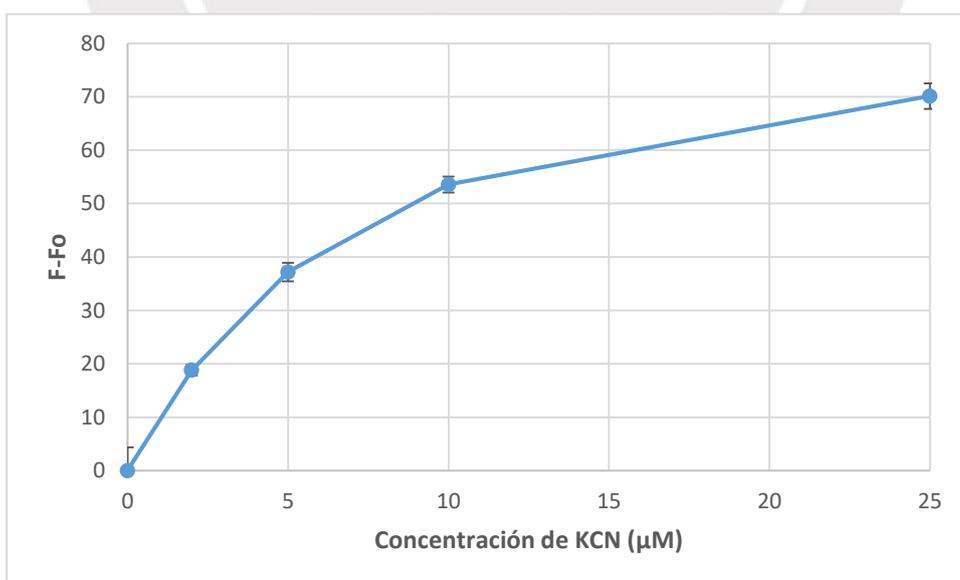


Figura 26. Curva de calibración del sensor de 3 nM AuNPs y 900 nM RB con patrones de KCN de 0 – 25 uM.

La curva de calibración elaborada después de la centrifugación permitió detectar con claridad una concentración de cianuro de 2 μM , la cual es menor a la cantidad máxima permitida en agua potable según la OMS⁶. Finalizada la optimización del sensor el siguiente paso es aplicar la metodología establecida para realizar las pruebas con interferentes.

4.3.6 Análisis de interferentes

4.3.6.1 Efecto de la dureza del agua

Los primeros interferentes analizados fueron los cationes de Ca^{2+} y Mg^{2+} , por ser los más abundantes en las muestras de interés. El patrón de KCN que se utilizó fue el de 100 μM ya que con lo visto anteriormente es fácilmente detectable con el sensor optimizado.

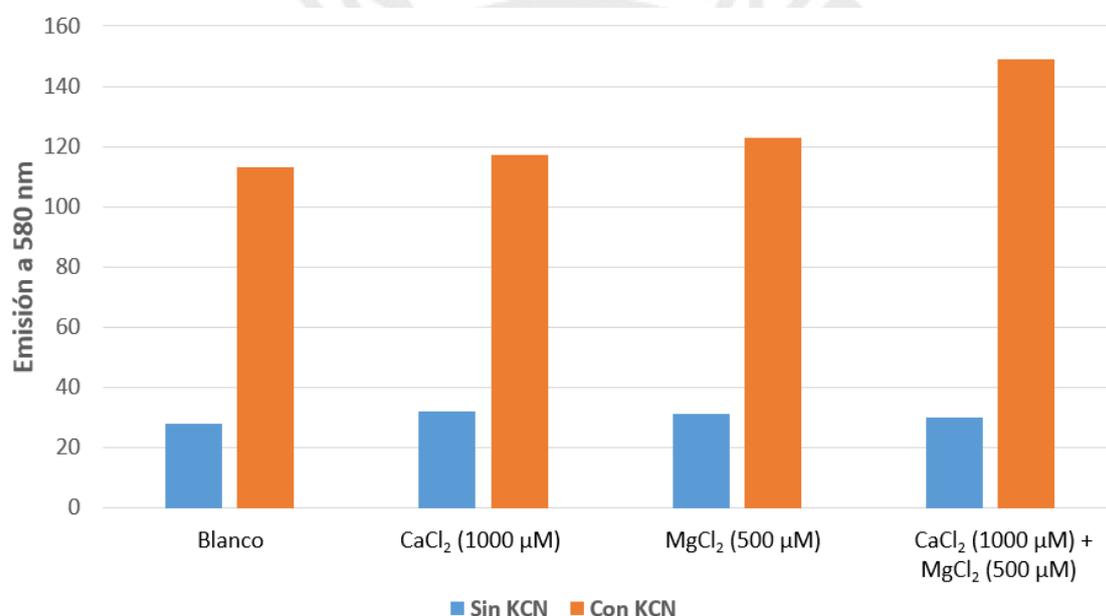


Figura 27. Efecto de los cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} en la detección de KCN.

El protocolo a seguir fue el establecido en la sección 4.2.6. La figura 27 muestra cierta interferencia de los cationes de calcio y magnesio en la detección de cianuro, especialmente cuando se tenían ambas sales simultáneamente. Como posible alternativa se decidió usar EDTA para evitar esta interferencia ya que este agente quelante es selectivo para cationes y no debería tener interacción con el anión CN^- . Se realizaron dos ensayos para determinar la cantidad de EDTA (1.5 y 3 mM) adecuada para atenuar la interferencia de los cationes. Las

mediciones fueron realizadas por triplicado y los resultados se muestran en la figura 28.

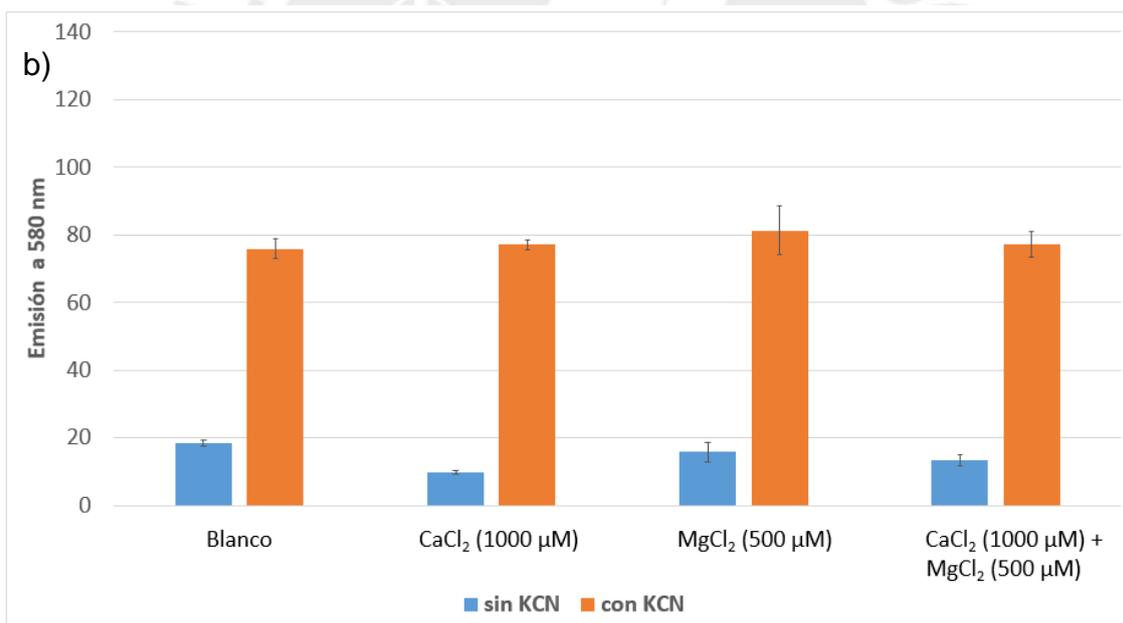
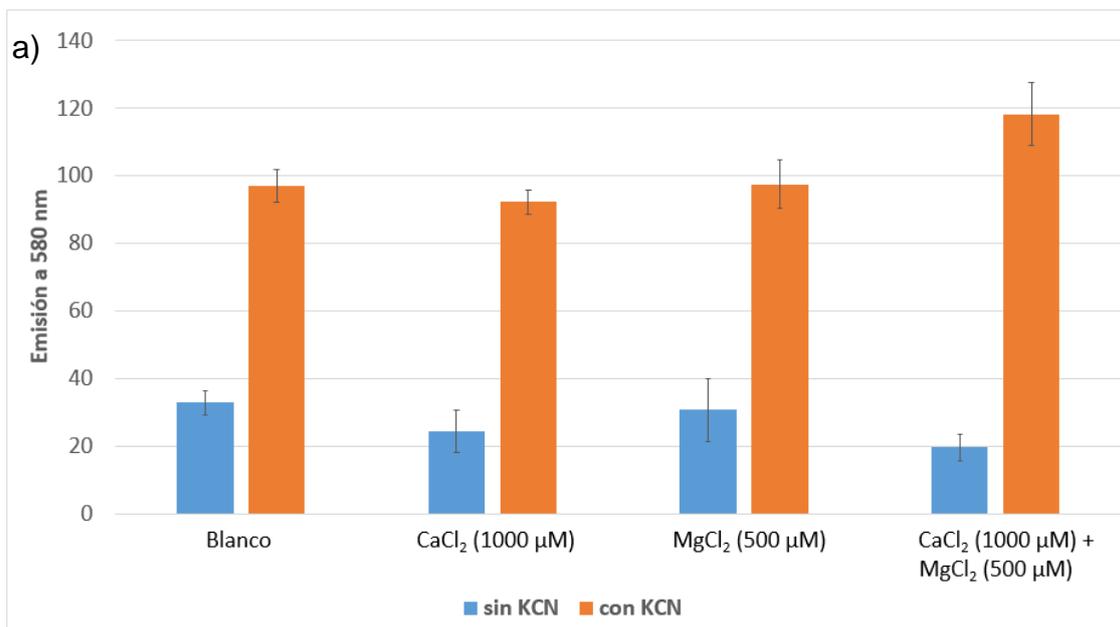


Figura 28. Análisis del efecto de la dureza del agua en la respuesta del sensor en presencia de EDTA con concentraciones de a) 1.5 mM. b) 3 mM.

Se observó que en presencia de EDTA 3 mM las interferencias de los cationes de calcio y magnesio son casi nulas incluso al estar presentes grandes concentraciones de ambos iones como se observa en la figura 29. Se decidió utilizar esta concentración de EDTA para el resto de ensayos.

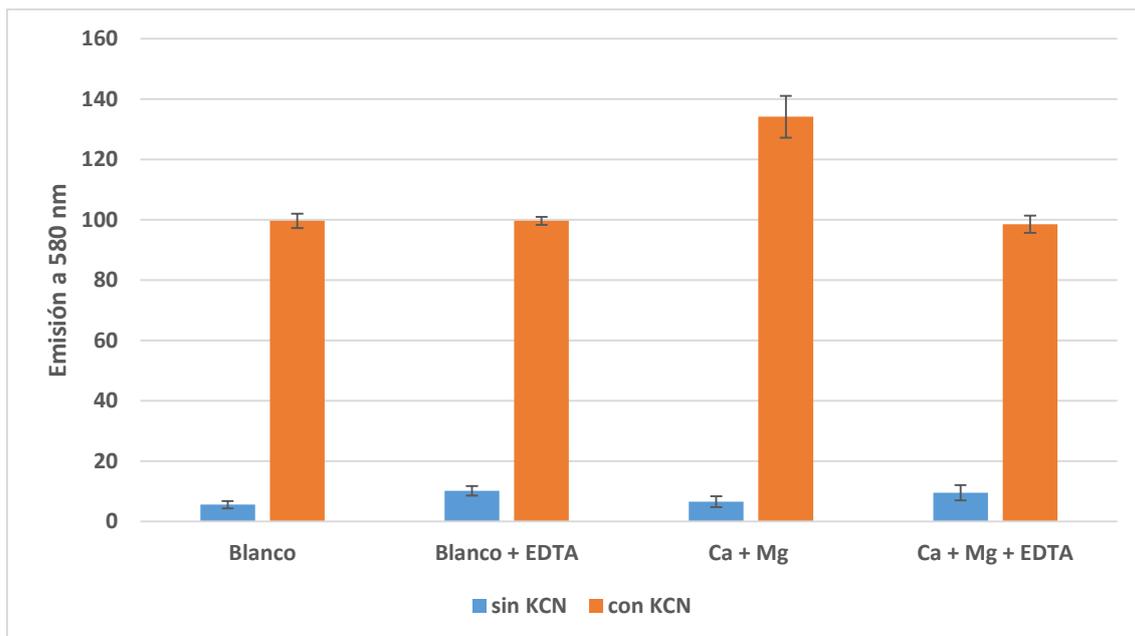


Figura 29. Gráfico de análisis de interferentes para ambos iones (Ca^{2+} y Mg^{2+}) en presencia y ausencia de EDTA 3 mM.

4.3.6.2 Efecto del EDTA sobre la curva de calibración

Debido a la adición del EDTA fue necesario evaluar su efecto sobre la curva de calibración del sensor optimizado de 3 nM AuNPs y 900 nM RB. Para ello, siguiendo los protocolos de funcionalización y detección establecidos en las secciones 4.2.4.2 y 4.3.5.3, se realizaron dos curvas de calibración. La figura 30 muestra la curva sin la presencia del agente quelante (a) y en presencia de EDTA 3 mM (b).

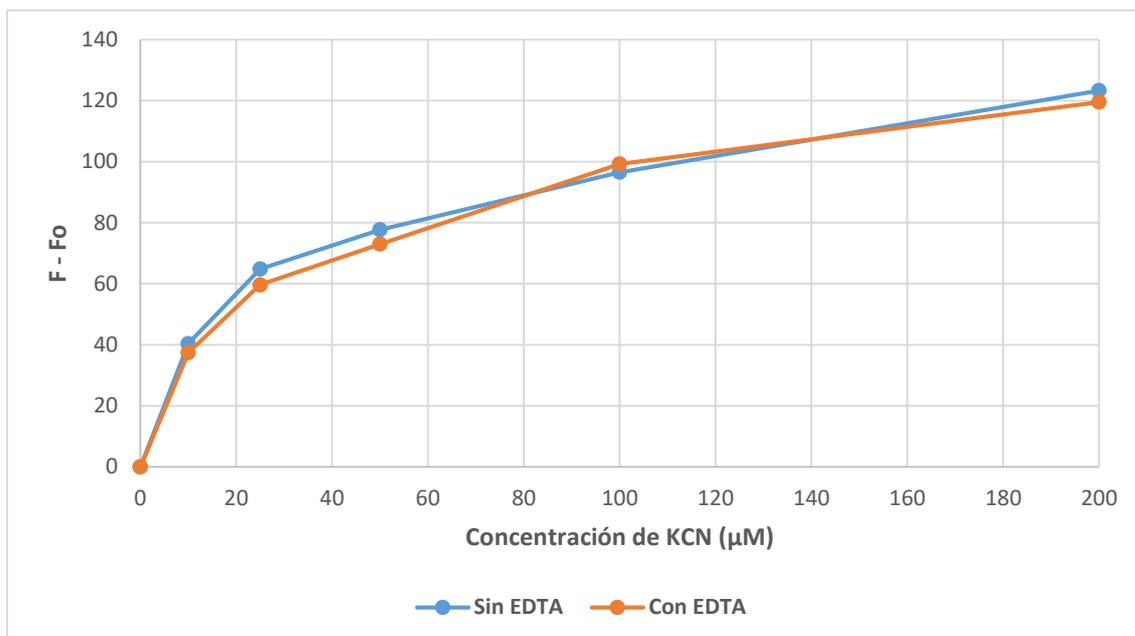


Figura 30. Análisis del efecto del EDTA en las curvas de calibración del sensor de 3 nM AuNPs y 900 nM RB.

Como se observa en la figura 30, no existe alguna alteración considerable en la curva de calibración debida a la presencia de EDTA. En consecuencia, se decidió continuar con el análisis de los demás interferentes.

4.3.6.3 Análisis de cationes y aniones

Este ensayo se llevó a cabo siguiendo el protocolo establecido para el análisis de interferentes (Sección 4.2.6). Se emplearon las siguientes sales SrCl_2 , Na_2CO_3 , NaHCO_3 , NaNO_3 , NaNO_2 , Na_2SO_4 , $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, NaF , KCl , FeCl_3 , $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ y FeSO_4 a la concentración final de 500 µM.

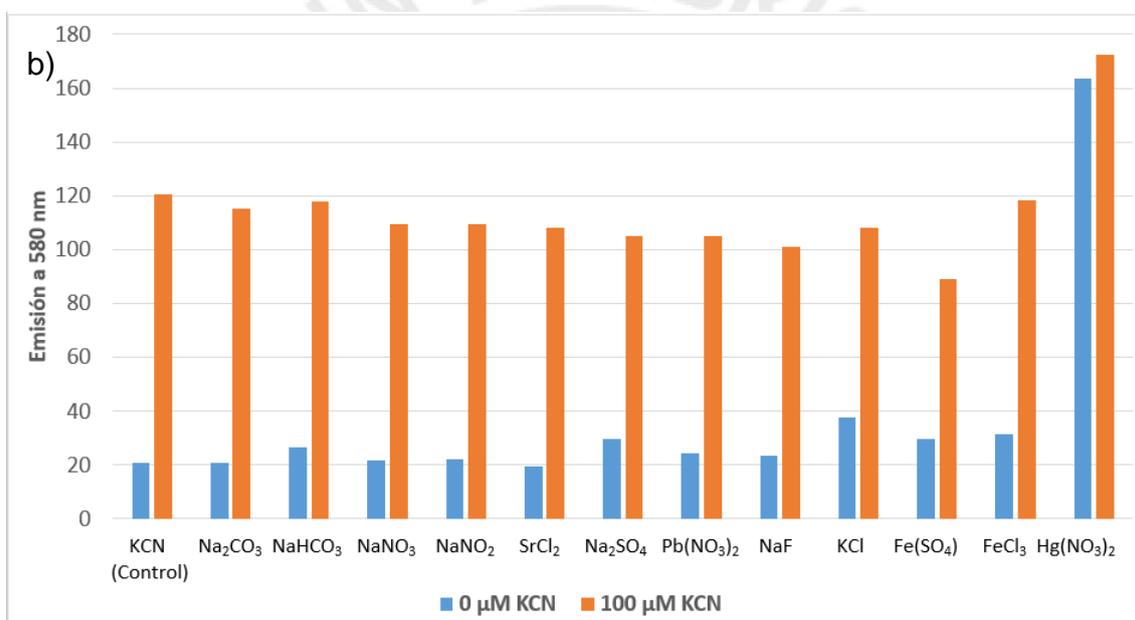
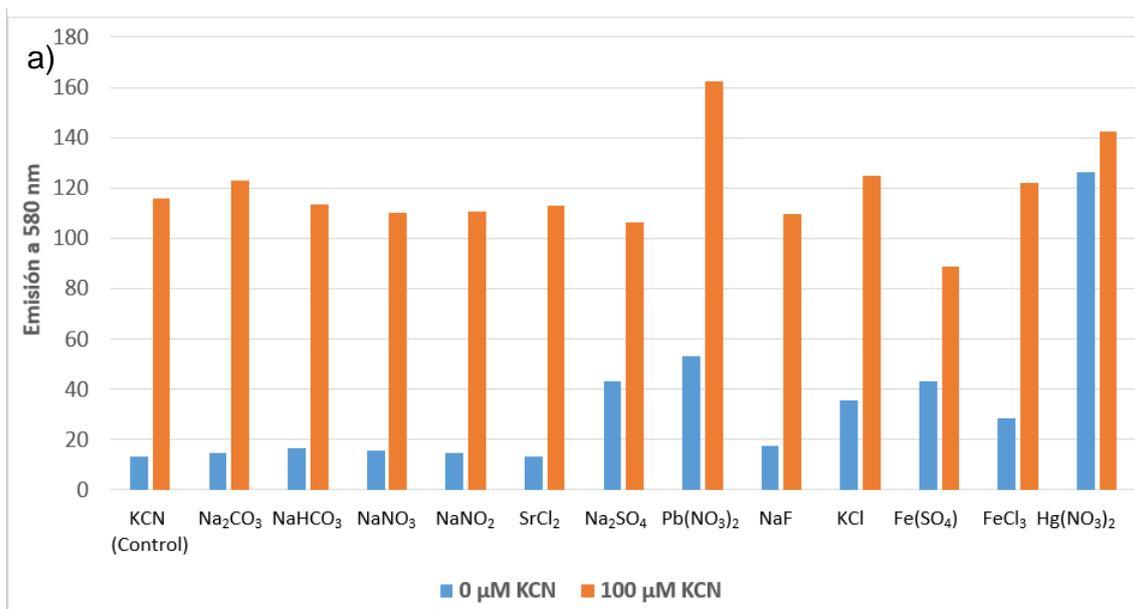


Figura 31. Análisis de interferentes en ausencia y presencia de EDTA. a) Ensayos sin EDTA. b) Ensayos con EDTA.

La figura 31 muestra la respuesta del sensor en presencia de cada una de las sales. La figura 31b muestra una atenuación de las interferencias debido a la presencia del EDTA, especialmente en el caso del catión Pb^{2+} en donde este efecto es sumamente notorio. Para el caso del catión Hg^{2+} , no se logró minimizar su interferencia ya que al igual que el anión cianuro tiene gran afinidad por el oro e interactúa fuertemente con las nanopartículas, aun en presencia del EDTA.

Se realizaron algunas pruebas en las que se intentó precipitar el mercurio presente en la muestra como HgO con ayuda del NaOH 0.1 M. La muestra se centrifugó a 15000 rpm por 10 minutos y se retiró el sobrenadante. Los resultados se muestran en la figura 32. El procedimiento de precipitación junto con la presencia de EDTA fueron efectivos para disminuir la señal originada por el catión (ver NaOH vs Hg + NaOH). No obstante, se observa todavía cierto grado de interferencia positiva cuando el catión y el cianuro se encuentran presentes simultáneamente (KCN + Hg + NaOH).

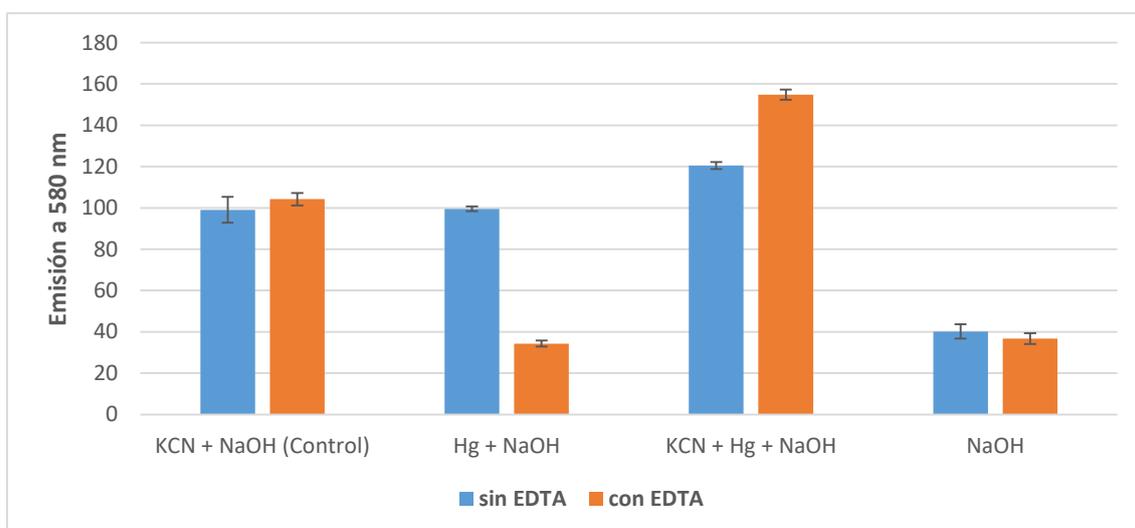


Figura 32. Efecto del Hg^{2+} como interferente en el ensayo de detección de cianuro.

4.3.7 Análisis de portabilidad y muestras reales

El sensor desarrollado se implementó en una plataforma portátil constituida por un miniespectrómetro y un puntero láser, tal como se describe en 4.2.7. Para esto, se realizó una curva de calibración en el rango de concentraciones de 0 a 200 μM tanto en el espectrofluorímetro como en el dispositivo portátil. La figura 33 muestra las curvas obtenidas por ambos equipos. No se observan diferencias significativas entre las curvas de calibración. El límite de detección es 2 μM en ambos instrumentos, calculado teniendo en consideración una relación señal/ruido igual a 3.

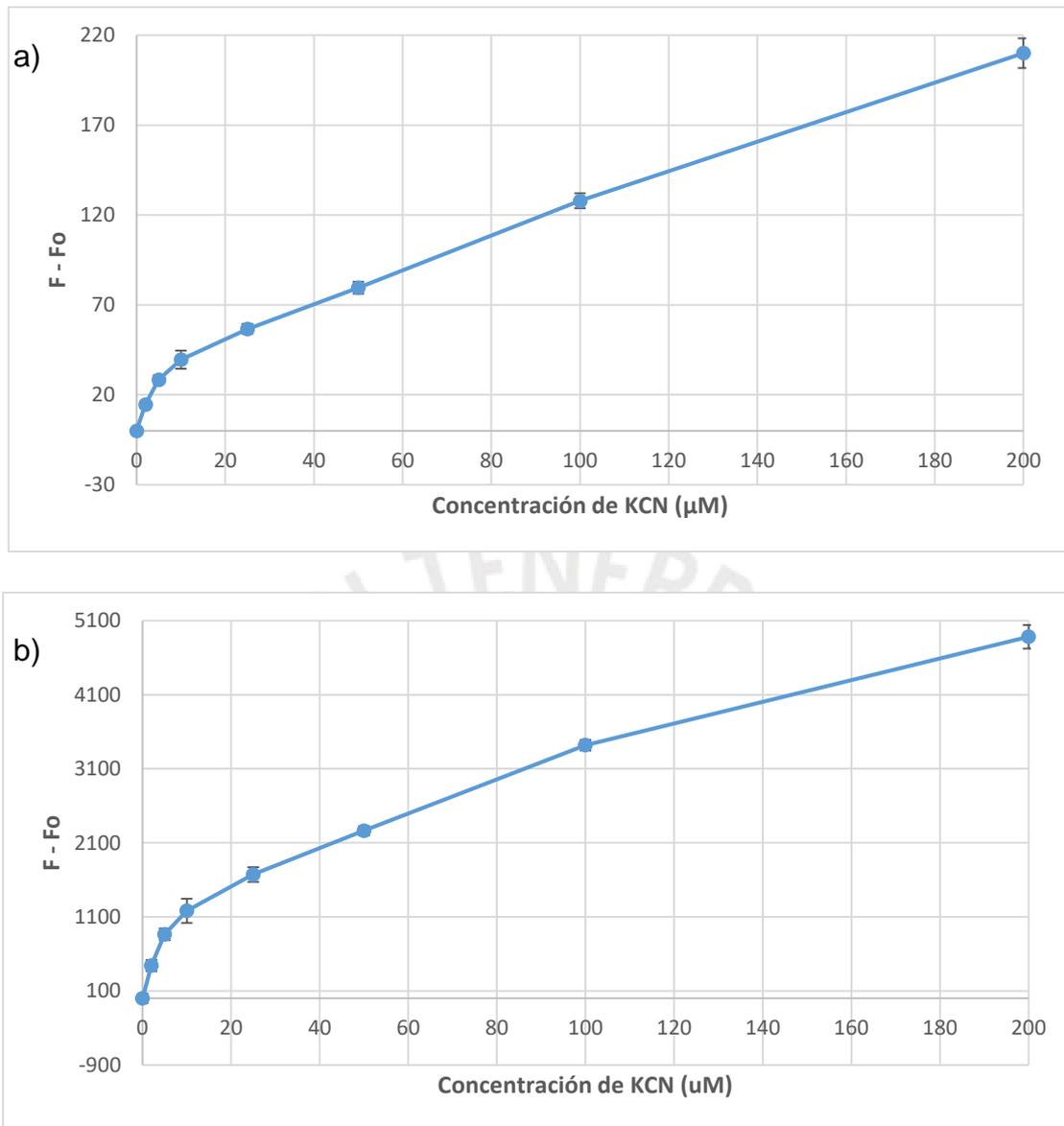


Figura 33. Análisis de la portabilidad del sensor para la detección de cianuro. a) Curva de calibración obtenida en el espectrofluorímetro Perkin Elmer LS 55. b) Curva de calibración obtenida en el espectrofluorímetro portátil.

Finalmente, al haber obtenido las curvas de calibración en ambos equipos, se procedió a evaluar la respuesta del sensor en presencia de muestras acuosas reales. Las muestras seleccionadas fueron agua mineral (San Mateo), agua del río Santa Eulalia y agua de caño tomada en el campus de la PUCP.

Los ensayos se realizaron siguiendo el protocolo descrito en la sección 4.2.8. La figura 34 muestra los resultados obtenidos. Se observó que es posible identificar la presencia de cianuro en matrices de agua complejas utilizando el

espectrofluorímetro de laboratorio y el equipo portátil sin que se observen diferencias marcadas en la respuesta de ambos.

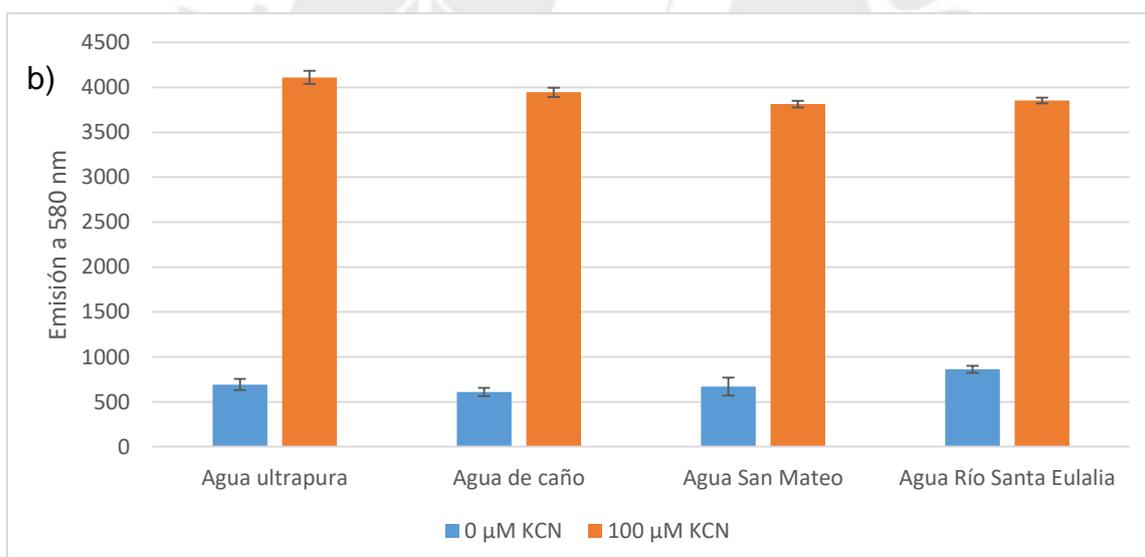
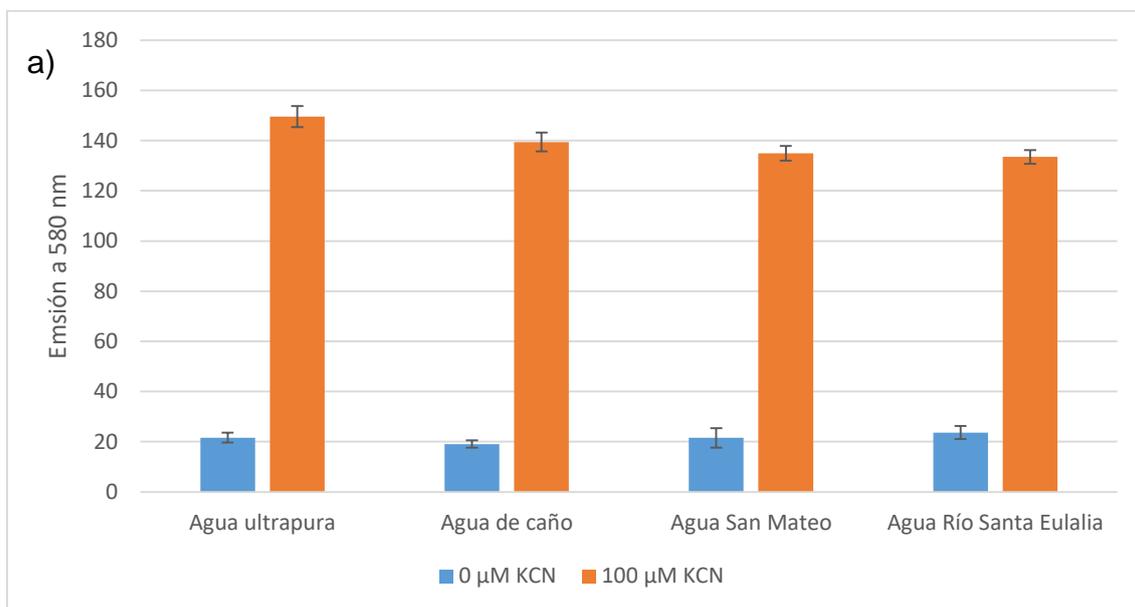


Figura 34. Análisis del contenido de KCN en muestras reales. a) Detección de KCN en el espectrofluorímetro PE LS 55. b) Detección de KCN en el equipo portátil.

5. Discusión de resultados

5.1 Síntesis y caracterización de AuNPs de 14 nm

La primera parte de esta investigación se basó en la síntesis y caracterización de AuNPs esféricas de 14 nm. Para ello se empleó la metodología establecida por Turkevich-Frens en la cual se utiliza una sal de oro (HAuCl_4) y citrato de sodio como agente reductor y estabilizante^{32,33}.

El tamaño de las AuNPs se estimó inicialmente en base a la longitud de onda del máximo de la banda LSPR (519 nm)⁷³, la cual puede observarse en la Fig. 12. A su vez, en colaboración con el IPHT, se obtuvieron imágenes AFM de las AuNPs sintetizadas, lo cual permitió conocer directamente su tamaño promedio y forma, tal como se muestra en la Fig. 13. El diámetro promedio obtenido mediante AFM concuerda bien con la estimación basada en la longitud de onda del máximo de la banda LSPR.

5.2 Ensayos de interacción entre los reactivos

Como ensayos preliminares a la funcionalización, se estudió la interacción entre las AuNPs, RB y cianuro con ayuda de la espectroscopía UV-Vis y Raman. Los espectros de absorción de la Fig. 14 muestran una disminución del máximo de absorción a medida que la concentración de cianuro aumenta. Esto se debe a que el anión corroe la superficie de las nanopartículas al formarse el complejo $\text{Au}(\text{CN})_2^-$ en solución acuosa⁵⁷. La representación esquemática de este proceso se muestra en la figura 35. Como consecuencia, al disolverse, las AuNPs disminuyen su tamaño hasta casi desaparecer (Figura 14a).

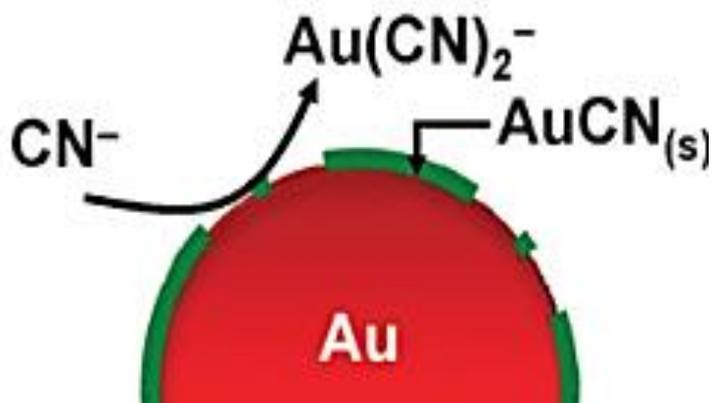


Figura 35. Formación del complejo $\text{Au}(\text{CN})_2^-$ por interacción de AuNPs con el anión CN^- ⁵⁷.

Los ensayos realizados utilizando espectroscopía Raman fueron desarrollados teniendo en cuenta que las AuNPs funcionan como nanoantenas y permiten incrementar la intensidad de la señal Raman de diferentes moléculas (SERS). Este fenómeno se debe al aumento del campo electromagnético en las inmediaciones de las nanopartículas, en especial cuando estas se encuentran muy cerca, ya que en esas zonas (conocidas como *hot spots*), se da el acoplamiento de los campos electromagnéticos de dos o más nanoestructuras. Es por ello que al funcionalizar las AuNPs con RB se observó un aumento en la intensidad de los picos del fluoróforo que no lograban verse al encontrarse la RB sola en solución. Una vez obtenido el sensor de 4 nM AuNPs y 50 μM RB, se realizó la detección con cianuro agregando diferentes concentraciones del anión.

La figura 15 muestra la respuesta del sensor de AuNPs (4 nM) y RB (50 μM) al añadir dos concentraciones de cianuro (5 y 50 μM). Nuevamente el mecanismo de acción del cianuro ocasionó la erosión de la superficie de las AuNPs y permitió la formación del complejo cuya señal debida al estiramiento del enlace $\text{C}\equiv\text{N}$ apareció alrededor de 2154 cm^{-1} ⁷². Como consecuencia de la erosión, el fluoróforo se desorbe de la superficie de las nanopartículas, volviendo a estar libre en solución lo que finalmente genera un decaimiento de sus señales. Con este sensor sólo fue posible detectar cantidades de hasta 5 μM de KCN cuya señal fue casi imperceptible en comparación a la de 50 μM debido a la baja concentración de cianuro para formar el complejo. Cabe resaltar que la

optimización utilizando espectroscopía Raman no ha concluido y abre las puertas para el desarrollo de nuevos sensores.

5.3 Funcionalización de AuNPs con rodamina B

El proceso de funcionalización de las nanopartículas de oro corresponde a la segunda parte de este trabajo de investigación. El proceso empieza por la unión electrostática entre la carga negativa del citrato y la carga positiva de la RB (Figura 36). Gracias al proceso NSET, la energía de emisión del agente fluorescente es transferida a las AuNPs desactivando la fluorescencia de la rodamina (Figura 16).

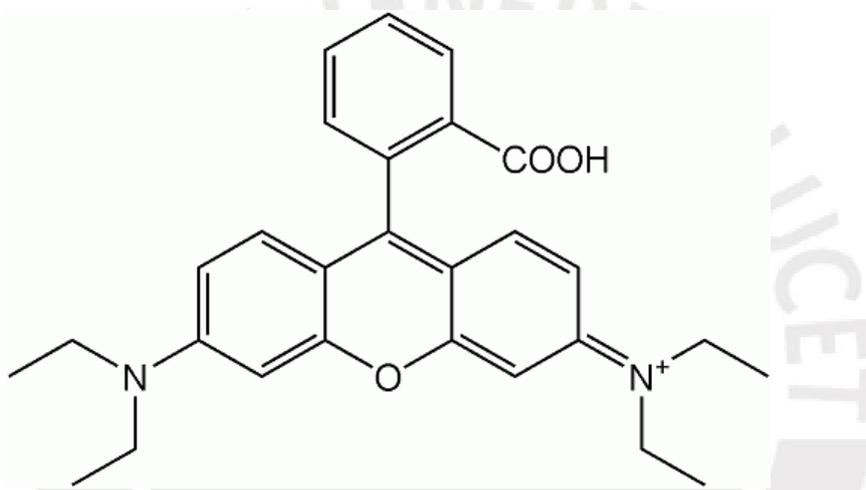


Figura 36. Estructura de la molécula de Rodamina B

Este comportamiento se observa claramente en la figura 16 de la sección 4.3.5, en la que se compara la fluorescencia de una solución de rodamina de 150 nM y la de una solución de AuNPs (1 nM) a la que se le añade el agente fluorescente cuya concentración final en el ensayo es también de 150 nM. En el primer caso la intensidad de fluorescencia elevada, por el contrario se observa que esta intensidad decae al añadirse las AuNPs hasta llegar a ser casi nula.

Para optimizar el ensayo de funcionalización se tuvo en cuenta la sensibilidad de las AuNPs al entorno que las rodea. Se decidió evaluar el efecto del buffer en el proceso, para lo cual se desarrollaron los experimentos propuestos en la sección 4.3.5.1 y cuyos resultados se aprecian en la figura 17. Se encontró que la presencia del buffer afecta la funcionalización, disminuyendo

su efectividad. Esto se debe probablemente al apantallamiento de la interacción electrostática entre AuNPs y RB originada por la presencia de los iones del buffer.

Para mejorar la reproducibilidad de los ensayos se decidió mantener el volumen (6 mL), tiempo (30 min) y temperatura (30°C) constantes durante la funcionalización, aunque en este último caso se recomienda realizar algunos ensayos variando la temperatura con el fin de optimizar el proceso de funcionalización.

Adicionalmente, se estudió el efecto de las concentraciones de las AuNPs y la RB durante la funcionalización y determinar la relación óptima entre ambos reactivos. Las figuras 22 y 23 muestran las primeras curvas de calibración obtenidas para el sensor de 3 nM AuNPs y 600 nM RB, el cual logró detectar hasta 5 μM de cianuro.

Al subir la concentración de RB a 900 nM y probar nuevamente la curva de calibración con los patrones de cianuro, se observó que el nuevo sensor podía detectar hasta 2 μM del anión aunque con márgenes de error muy elevados (Fig. 24). Por esta razón, se la centrifugo antes de la detección con el fin de retirar el exceso de RB que no se adsorbe adecuadamente en las AuNPs. Este paso previo evitó que exista una gran cantidad de fluoróforo libre en la solución y que podría conducir a mediciones poco confiables.

Finalmente, se escogieron las concentraciones de 3 nM de AuNPs y 900 nM de RB para la funcionalización del sensor y se optimizó el ensayo removiendo el exceso de RB en solución mediante centrifugación. Gracias a este paso adicional, se logró mejorar la reproducibilidad de las mediciones tal como se muestra en la figura 26 y detectar con precisión hasta 2 μM de CN^- .

5.4 Detección de cianuro

La detección de cianuro es posible debido a la disolución de las AuNPs causada por el anión, que disminuye el área superficial disponible y por tanto origina la desorción de la RB. El fluoróforo liberado, lejos de la superficie de las AuNPs, no experimenta el proceso de transferencia de energía y por tanto la fluorescencia propia de la RB se restablece (Figura 37).

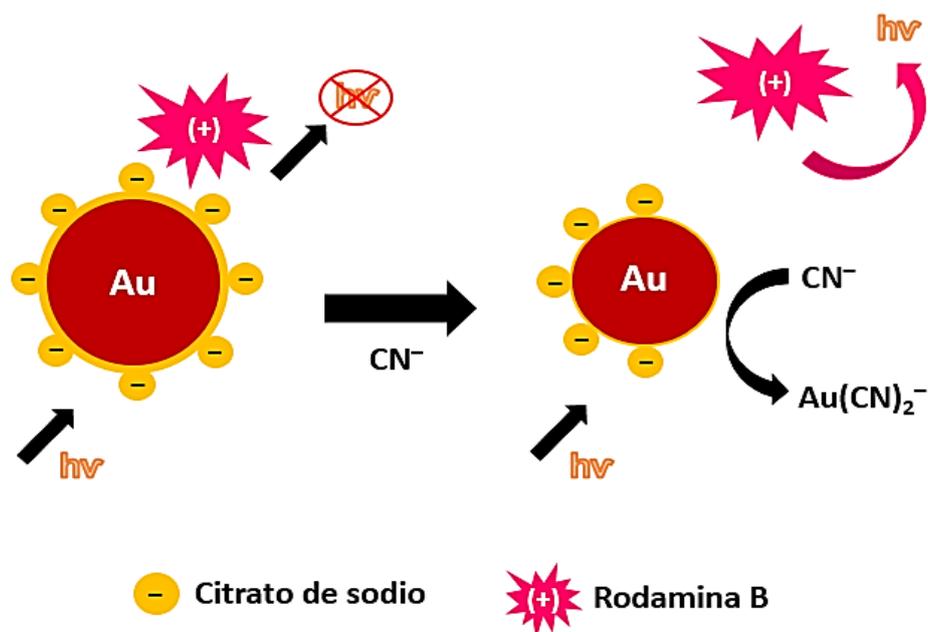


Figura 37. Restablecimiento de la fluorescencia a partir de la desorción de la Rodamina B debido a la corrosión de las AuNPs ocasionada por el anión CN^- .

La concentración de RB empleada durante la funcionalización influyó en la sensibilidad del ensayo de detección de cianuro. Se encontró que una mayor concentración de RB (900 nM versus 600 nM) permitió detectar menores concentraciones de cianuro. Esto se debe a que si se tiene mayor cantidad de RB adsorbida en la superficie de las nanopartículas es posible liberar mayor cantidad de este fluoróforo a la solución al momento de agregar el cianuro, aun cuando este último se encuentre en bajas concentraciones, obteniéndose una mejor señal.

El sensor optimizado mostró un límite de detección de 2 μM (sección 4.3.7), concentración menor al límite máximo de cianuro permitido en agua potable según la OMS⁶.

5.5 Estudio de interferentes

El estudio de interferentes tuvo como objetivo evaluar la respuesta del sensor en matrices de agua complejas, las cuales contienen diferentes aniones y cationes provenientes de sales inorgánicas disueltas en el agua. Para realizar los ensayos se emplearon las sales inorgánicas más comúnmente encontradas en muestras de agua potable de la ciudad de Lima.⁴¹

Se encontró un grado de interferencia positiva cuando los iones Mg^{2+} y Ca^{2+} se encontraban presentes simultáneamente a 500 μM y 1000 μM , respectivamente, tal como ilustra la figura 27. Este efecto se debe a que dichos cationes desplazaban a la RB de la superficie de las AuNPs evitando la transferencia de energía y liberando el fluoróforo cuya señal era observada al estar presente en mayor proporción en la solución. Para evitar este problema, se empleó el agente quelante EDTA, que captura los cationes metálicos formando complejos. No se observó interferencia de los cationes Mg^{2+} y Ca^{2+} en presencia de EDTA, tal como muestra la figura 29. Por ello, se incluyó EDTA en el protocolo optimizado 4.2.5.3.

Además de los iones Mg^{2+} y Ca^{2+} , se evaluó adicionalmente el efecto de los cationes Sr^{2+} , Na^+ , Pb^{2+} , K^+ , Fe^{2+} , Fe^{3+} y Hg^{2+} ; así como de los aniones Cl^- , CO_3^{2-} , HCO_3^- , NO_3^- , NO_2^- , SO_4^{2-} y F^- , tal como muestra la figura 31. Solo el catión Hg^{2+} mostró una interferencia significativa. Darbha y col. desarrollaron un sensor de AuNPs y RB basado en NSET para la detección de este catión con el cual obtuvieron límites de detección por debajo de los establecidos por la EPA ($7.6 \times 10^{-8} M$). El mecanismo que se describe en la investigación de Darbha es muy similar al mecanismo planteado para la detección de cianuro, ya que en presencia de Hg^{2+} , la RB es liberada de la superficie de las AuNPs y por ello es posible observar la diferencia en la señal de fluorescencia tal y como ocurría con el anión. Para mejorar la selectividad del sensor ante otros cationes, Darbha y col. modificaron la superficie de las nanopartículas con ácido mercaptopropionico y homocisteína, a su vez añadieron PDCA, un agente quelante específico para mercurio. El sensor fue probado en diferentes matrices complejas dando buenos resultados⁷⁴. Sin embargo, el estudio no evaluó la potencial interferencia del anión cianuro.

Finalmente, dado que no se pudo evitar la interferencia del ion Hg^{2+} , se recomienda probar con agentes quelantes específicos para este catión como el PDCA utilizado en la investigación de Darbha.

5.6 Estudio de portabilidad

Este estudio buscó lograr que el sensor pueda detectar la presencia de cianuro utilizando un espectrómetro de fluorescencia portátil. La ventaja de esta implementación es que se puede tener un sistema menos costoso, práctico y de fácil manejo que permita detectar la presencia del anión con el mismo límite de detección que un equipo de laboratorio, con lo cual no sería necesario trasladar las muestras a un centro de análisis sino que las mediciones podrían efectuarse en el mismo lugar de la investigación permitiendo obtener resultados en tiempo real.

Para el equipo portátil se empleó un puntero láser como fuente de excitación y un miniespectrómetro, ambos acoplados directamente al portacubeta (Fig. 11). No se encontraron diferencias significativas en la respuesta del sensor monitoreada mediante el equipo portátil y el espectrofluorímetro de laboratorio, tal como se muestra en la figura 35. En ambos casos, el límite de detección obtenido fue de $2 \mu\text{M}$ de KCN.

Por lo tanto, se concluye que el sensor desarrollado puede ser usado en plataformas portátiles sin que esto afecte la respuesta del sensor y su sensibilidad.

5.7 Aplicación del sensor en muestras reales

Luego de haber realizado los ensayos de interferentes y el estudio de portabilidad del sensor, se evaluó su respuesta en presencia de muestras reales de agua del Rio Santa Eulalia, agua del caño y agua San Mateo. Los resultados medidos en el equipo portátil y el de laboratorio, mostrados en la figura 34, indicaron que las matrices complejas no afectaron significativamente la respuesta del sensor. Por ello, se concluye que es posible la aplicación práctica del sensor en matrices de agua complejas incluso utilizando el equipo portátil.

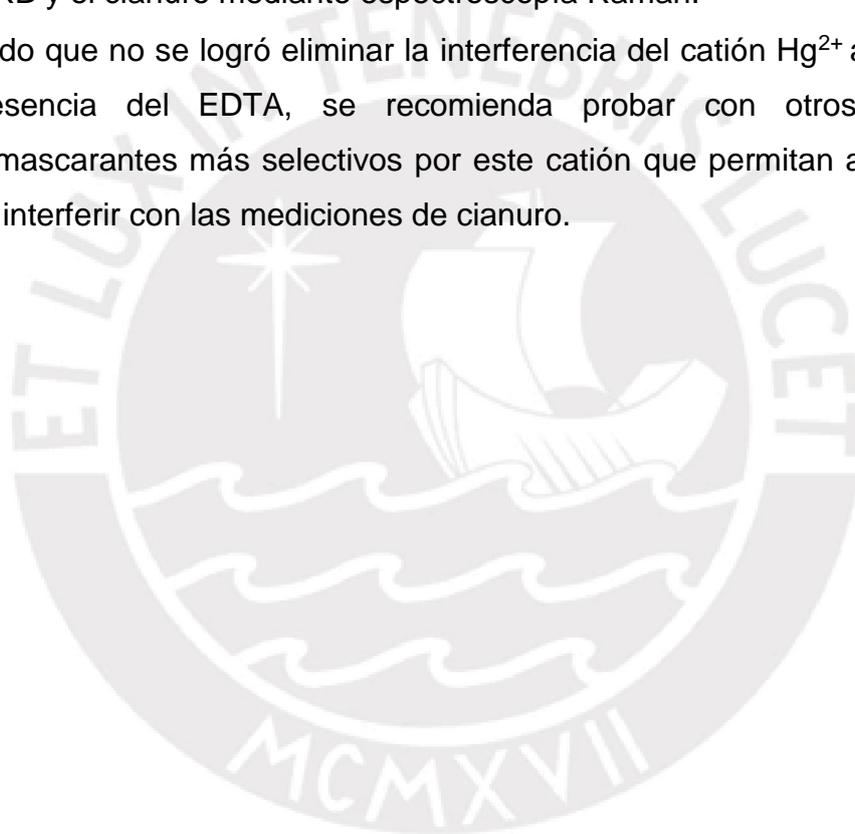
6. Conclusiones y recomendaciones

6.1 Conclusiones

- Las AuNPs sintetizadas por el método de Turkevich-Frens tienen un diámetro promedio de 14 nm de acuerdo a la caracterización por AFM y espectroscopía UV-Vis.
- Las AuNPs funcionalizadas con rodamina B permitieron detectar cantidades de cianuro de hasta 2 μM mediante fluorescencia, valor menor al límite máximo de cianuro permitido en agua potable establecido por la OMS (2.7 μM).
- El sensor de cianuro desarrollado mostró buena selectividad ante los interferentes evaluados en presencia de EDTA, a excepción del catión Hg^{2+} .
- Las curvas de calibración obtenidas con el espectrofluorímetro de laboratorio y el espectrómetro de fluorescencia portátil no mostraron diferencias significativas.
- El análisis de muestras reales demostró que es posible detectar la presencia de cianuro incluso en aguas de alta dureza como las evaluadas en esta investigación. A su vez, se demostró que el ensayo de muestras reales también puede llevarse a cabo en el equipo portátil sin afectar la sensibilidad del sensor.

6.2 Recomendaciones

- El sensor propuesto en esta investigación mostró un límite de detección compatible con límite máximo de cianuro permitido en agua potable establecido por la OMS. Sin embargo, se recomienda continuar con la optimización de la sensibilidad del sensor teniendo en cuenta algunas condiciones que no han sido variadas durante la presente investigación, como por ejemplo, probar la funcionalización de las AuNPs a diferentes temperaturas.
- Se recomienda también estudiar más a fondo la interacción de las AuNPs, la RB y el cianuro mediante espectroscopía Raman.
- Dado que no se logró eliminar la interferencia del catión Hg^{2+} aún con la presencia del EDTA, se recomienda probar con otros agentes enmascarantes más selectivos por este catión que permitan atraparlo y no interferir con las mediciones de cianuro.



7. Referencias Bibliográficas

- (1) Shang, L.; Jin, L.; Dong, S. Sensitive Turn-on Fluorescent Detection of Cyanide Based on the Dissolution of Fluorophore Functionalized Gold Nanoparticles. *Chem. Commun.* **2009**, No. 21, 3077.
- (2) Hernández, Y.; Coello, Y.; Fratila, R. M.; de la Fuente, J. M.; Lionberger, T. A. Highly Sensitive Ratiometric Quantification of Cyanide in Water with Gold Nanoparticles via Resonance Rayleigh Scattering. *Talanta* **2017**, *167*, 51–58.
- (3) U.S. Department of Health and Human Services PHS. Toxicological Profile for Cyanide. *US Dep. Heal. Hum. Serv.* **2006**, No. July, 298.
- (4) Simeonova, F.; Fishbein, L. Hydrogen Cyanide and Cyanides: Human Health Aspects. *World Heal. Organ. Geneva* **2004**.
- (5) Baumeister, R. G.; Schievelbein, H.; Zickgraf-Rüdel, G. Toxicological and Clinical Aspects of Cyanide Metabolism. *Arzneimittelforschung.* **1975**, *25* (7), 1056–1064.
- (6) Liu, Y.; Ai, K.; Cheng, X.; Huo, L.; Lu, L. Gold-Nanocluster-Based Fluorescent Sensors for Highly Sensitive and Selective Detection of Cyanide in Water. *Adv. Funct. Mater.* **2010**, *20* (6), 951–956.
- (7) Ma, J.; Dasgupta, P. K. Recent Developments in Cyanide Detection: A Review. *Anal. Chim. Acta* **2010**, *673* (2), 117–125.
- (8) Ishii, A.; Seno, H.; Watanabe-Suzuki, K.; Suzuki, O.; Kumazawa, T. Determination of Cyanide in Whole Blood by Capillary Gas Chromatography with Cryogenic Oven Trapping. *Anal. Chem.* **1998**, *70* (22), 4873–4876.
- (9) Suzuki, T.; Hioki, A.; Kurahashi, M. Development of a Method for Estimating an Accurate Equivalence Point in Nickel Titration of Cyanide Ions. *Anal. Chim. Acta* **2003**, *476* (1), 159–165.

- (10) Odago, M. O.; Colabello, D. M.; Lees, A. J. A Simple Thiourea Based Colorimetric Sensor for Cyanide Anion. *Tetrahedron* **2010**, *66* (38), 7465–7471.
- (11) Liu, D.; Wang, Z.; Jiang, X. Gold Nanoparticles for the Colorimetric and Fluorescent Detection of Ions and Small Organic Molecules. *Nanoscale* **2011**, *3* (4), 1421.
- (12) Cheng, C.; Chen, H. Y.; Wu, C. S.; Meena, J. S.; Simon, T.; Ko, F. H. A Highly Sensitive and Selective Cyanide Detection Using a Gold Nanoparticle-Based Dual Fluorescence-Colorimetric Sensor with a Wide Concentration Range. *Sensors Actuators, B Chem.* **2016**, *227*, 283–290.
- (13) Ling, J.; Huang, C. Z. Energy Transfer with Gold Nanoparticles for Analytical Applications in the Fields of Biochemical and Pharmaceutical Sciences. *Anal. Methods* **2010**, *2* (10), 1439.
- (14) Ghosh, D.; Chattopadhyay, N. Gold and Silver Nanoparticles Based Superquenching of Fluorescence: A Review. *Journal of Luminescence.* **2015**, 223–232.
- (15) Sen, T.; Patra, A. Recent Advances in Energy Transfer Processes in Gold-Nanoparticle-Based Assemblies. *J. Phys. Chem. C* **2012**, *116* (33), 17307–17317.
- (16) Roco, M. C. Nanoparticles and Nanotechnology Research. *J. Nanoparticle Res.* **1999**, *1*, 1–6.
- (17) “Plenty of Room” Revisited. *Nat. Nanotechnol.* **2009**, *4* (12), 781–781.
- (18) Jain, P. K.; Huang, X.; El-Sayed, I. H.; El-Sayed, M. A. Noble Metals on the Nanoscale: Optical and Photothermal Properties and Some Applications in Imaging, Sensing, Biology, and Medicine. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41* (12), 1578–1586.
- (19) Song, S. Y. [Future Direction of Nanomedicine in Gastrointestinal Cancer]. *The Korean journal of gastroenterology = Taehan Sohwagi Hakhoe chi.* **2007**, 271–279.

- (20) Daniel, M. C. M.; Astruc, D. Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size Related Properties and Applications toward Biology, Catalysis and Nanotechnology. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 293–346.
- (21) Bahadar, H.; Maqbool, F.; Niaz, K.; Abdollahi, M. Toxicity of Nanoparticles and an Overview of Current Experimental Models. *Iran. Biomed. J.* **2016**, *20* (1), 1–11.
- (22) Holister, P.; Weener, J.-W.; Vas, C. R.; Harper, T.; Cientifica. Nanoparticles: Technology White Paper No.3. *Científica* **2003**, No. 3, 11.
- (23) Leonhardt, U. Optical Metamaterials: Invisibility Cup. *Nat. Photonics* **2007**, *1* (4), 207–208.
- (24) BARBER, D. J.; FREESTONE, I. C. An Investigation of the Origin of the Colour of the Lycurgus Cup By Analytical Transmission Electron Microscopy. *Archaeometry* **1990**, *32* (1), 33–45.
- (25) Hunt, L. B. The True Story of Purple of Cassius. *Gold Bull.* **1976**, *9* (4), 134–139.
- (26) Li, Z.; Miao, X.; Cheng, Z.; Wang, P. Hybridization Chain Reaction Coupled with the Fluorescence Quenching of Gold Nanoparticles for Sensitive Cancer Protein Detection. *Sensors Actuators, B Chem.* **2017**, *243*, 731–737.
- (27) Shan, Y.; Liu, Z.; Cao, D.; Liu, G.; Guan, R.; Sun, N.; Wang, C.; Wang, K. Coumarinic Chalcone Derivatives as Chemosensors for Cyanide Anions and Copper Ions. *Sensors Actuators, B Chem.* **2015**, *221*, 463–469.
- (28) Alex, S.; Tiwari, A. Functionalized Gold Nanoparticles: Synthesis, Properties and Applications—A Review. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2015**, *15* (3), 1869–1894.
- (29) Eustis, S.; El-Sayed, M. A. Why Gold Nanoparticles Are More Precious than Pretty Gold: Noble Metal Surface Plasmon Resonance and Its Enhancement of the Radiative and Nonradiative Properties of Nanocrystals of Different Shapes. *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35* (3), 209–217.

- (30) Link, S.; El-sayed, M. A. *International Reviews in Physical Chemistry Shape and Size Dependence of Radiative, Non-Radiative and Photothermal Properties of Gold Nanocrystals*; **2000**; Vol. 19.
- (31) Szunerits, S.; Spadavecchia, J.; Boukherroub, R. Surface Plasmon Resonance: Signal Amplification Using Colloidal Gold Nanoparticles for Enhanced Sensitivity. *Rev Anal Chem* **2014**, 33 (3), 153–164.
- (32) Turkevich, John; Cooper, P. H. J. A Study of the Nucleation and Growth Process in the Synthesis of Colloidal Gold. *Discuss. Faraday Soc.* **1951**, 55 (c), 55–75.
- (33) FRENS, G. Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions. *Nat. Phys. Sci.* **1973**, 241 (105), 20–22.
- (34) Zhou, J.; Ralston, J.; Sedev, R.; Beattie, D. A. Functionalized Gold Nanoparticles: Synthesis, Structure and Colloid Stability. *J. Colloid Interface Sci.* **2009**, 331 (2), 251–262.
- (35) Ghosh, D.; Chattopadhyay, N. Gold Nanoparticles: Acceptors for Efficient Energy Transfer from the Photoexcited Fluorophores. *Opt. Photonics J.* **2013**, 3 (1), 18–26.
- (36) Haiss, W.; Thanh, N. T. K.; Aveyard, J.; Fernig, D. G. Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV-Vis Spectra. *Anal. Chem.* **2007**, 79 (11), 4215–4221.
- (37) Zhang, J. F.; Zhou, Y.; Yoon, J.; Kim, J. S. Recent Progress in Fluorescent and Colorimetric Chemosensors for Detection of Precious Metal Ions (Silver, Gold and Platinum Ions). *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40 (7), 3416–3429.
- (38) Que, E. L.; Domaille, D. W.; Chang, C. J. Metals in Neurobiology: Probing Their Chemistry and Biology with Molecular Imaging. *Chem. Rev.* **2008**, 108 (5), 1517–1549.

- (39) Young, C. A.; Twidwell, L. G.; Anderson, C. G.; Minerals, M. and M. S. E. and P. D.; Minerals, M. and M. S. M. (2001 : N. O.; Symposium on Cyanide: Social, I. and E. A. (2001 : N. O. *Cyanide : Social, Industrial and Economic Aspects*; TMS, **2001**.
- (40) Solomonson, L. P. Cyanide in Biology. In *Cyanide in Biology*; **1981**;11.
- (41) Dirección General de Salud. Reglamento de La Calidad Del Agua Para Consumo Humano. *Dir. Gen. Salud Ambient. del Minist. Salud* **2009**, 46.
- (42) Nagashima, S.; Ozawa, T. International Journal of Environmental Analytical Chemistry Spectrophotometric Determination of Cyanide with Isonicotinic Acid and Barbituric Acid. No. September 2013, 37–41.
- (43) Singh, H. B.; Wasi, N.; Mehra, M. C. Detection and Determination of Cyanide--a Review. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **1986**, 26 (2), 115–136.
- (44) Michaowski, T.; Asuero, A. G.; Ponikvar-Svet, M.; Toporek, M.; Pietrzyk, A.; Rymanowski, M. Liebig-Denigès Method of Cyanide Determination: A Comparative Study of Two Approaches. *J. Solution Chem.* **2012**, 41 (7), 1224–1239.
- (45) Yari, A.; Sepahvand, R. Highly Sensitive Carbon Paste Electrode with Silver-Filled Carbon Nanotubes as a Sensing Element for Determination of Free Cyanide Ion in Aqueous Solutions. *Microchim. Acta* **2011**, 174 (3), 321–327.
- (46) Taheri, A.; Noroozifar, M.; Khorasani-Motlagh, M. Investigation of a New Electrochemical Cyanide Sensor Based on Ag Nanoparticles Embedded in a Three-Dimensional Sol-Gel. *J. Electroanal. Chem.* **2009**, 628 (1–2), 48–54.
- (47) Cheng, J.; Jandik, P.; Avdalovic, N. Pulsed Amperometric Detection of Sulfide, Cyanide, Iodide, Thiosulfate, Bromide and Thiocyanate with Microfabricated Disposable Silver Working Electrodes in Ion Chromatography. *Anal. Chim. Acta* **2005**, 536 (1–2), 267–274.

- (48) Gambaro, V.; Arnoldi, S.; Casagni, E.; Dell'Acqua, L.; Pecoraro, C.; Froidi, R. Blood Cyanide Determination in Two Cases of Fatal Intoxication: Comparison between Headspace Gas Chromatography and a Spectrophotometric Method. In *Journal of Forensic Sciences*; **2007**; Vol. 52, 1401–1404.
- (49) Applications, B.; Prefectural, S.; Headquarters, P.; University, S. M. *Journal of Chromatography*, 490 (1989) 319-327 Biomedical Applications. **1989**, 490, 319–327.
- (50) Dumas, P.; Gingras, G.; LeBlanc, A. Isotope Dilution-Mass Spectrometry Determination of Blood Cyanide by Headspace Gas Chromatography. *J. Anal. Toxicol.* **2005**, 29 (1), 71–75.
- (51) APHA/AWWA/WEF. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. *Stand. Methods* **2012**, 541.
- (52) Li, Y.; Wang, Q.; Zhou, X.; Wen, C.; Yu, J.; Han, X.; Li, X.; Yan, Z.; Zeng, J. A Convenient Colorimetric Method for Sensitive and Specific Detection of Cyanide Using Ag@Au Core-shell Nanoparticles. *Sensors Actuators B Chem.* **2016**, 228, 366–372.
- (53) Tomasulo, M.; Raymo, F. M. Colorimetric Detection of Cyanide with a Chromogenic Oxazine. *Org. Lett.* **2005**, 7 (21), 4633–4636.
- (54) Männel-Croisé, C.; Zelder, F. Side Chains of Cobalt Corrinoids Control the Sensitivity and Selectivity in the Colorimetric Detection of Cyanide. *Inorg. Chem.* **2009**, 48 (4), 1272–1274.
- (55) Chen, H.; Liu, Z.; Cao, D.; Lu, S.; Pang, J.; Sun, Y. Two New Fluorescence Turn-on Chemosensors for Cyanide Based on Dipyridylamine and Aurone Moiety. *Sensors Actuators, B Chem.* **2014**, 199, 115–120.
- (56) Hajizadeh, S.; Farhadi, K.; Forough, M.; Sabzi, R. E. Silver Nanoparticles as a Cyanide Colorimetric Sensor in Aqueous Media. *Anal. Methods* **2011**, 3, 2599.

- (57) Liu, C.-Y.; Tseng, W.-L. Colorimetric Assay for Cyanide and Cyanogenic Glycoside Using Polysorbate 40-Stabilized Gold Nanoparticles. *Chem. Commun.* **2011**, 47 (9), 2550.
- (58) Yun, C. S.; Javier, A.; Jennings, T.; Fisher, M.; Hira, S.; Peterson, S.; Hopkins, B.; Reich, N. O.; Strouse, G. F. Nanometal Surface Energy Transfer in Optical Rulers, Breaking the FRET Barrier. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127 (9), 3115–3119.
- (59) Chance, R. R.; Prock, A.; Silbey, R. Molecular Fluorescence and Energy Transfer near Interfaces. *Adv. Chem. Phys.* **1978**, X, 1–65.
- (60) Saini, S.; Srinivas, G.; Bagchi, B. Distance and Orientation Dependence of Excitation Energy Transfer: From Molecular Systems to Metal Nanoparticles. *J. Phys. Chem. B* **2009**, 113 (7), 1817–1832.
- (61) Jennings, T. L.; Singh, M. P.; Strouse, G. F. Fluorescent Lifetime Quenching near D = 1.5 Nm Gold Nanoparticles: Probing NSET Validity. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128 (16), 5462–5467.
- (62) Jennings, T. L.; Schlatterer, J. C.; Singh, M. P.; Greenbaum, N. L.; Strouse, G. F. NSET Molecular Beacon Analysis of Hammerhead RNA Substrate Binding and Catalysis. *Nano Lett.* **2006**, 6 (7), 1318–1324.
- (63) Sen, T.; Sadhu, S.; Patra, A. Surface Energy Transfer from Rhodamine 6G to Gold Nanoparticles: A Spectroscopic Ruler. *Appl. Phys. Lett.* **2007**, 91 (4), 1–4.
- (64) Lakowicz, J. R. Energy Transfer. *Princ. Fluoresc. Spectrosc.* **2006**, 443–475.
- (65) Algar, W. R.; Krull, U. J. Quantum Dots as Donors in Fluorescence Resonance Energy Transfer for the Bioanalysis of Nucleic Acids, Proteins, and Other Biological Molecules. *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* **2008**, 1609–1618.
- (66) Sapsford, K. E.; Berti, L.; Medintz, I. L. Materials for Fluorescence Resonance Energy Transfer Analysis: Beyond Traditional Donor-Acceptor Combinations. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2006**, 45 (28), 4562–4588.

- (67) Stobiecka, M.; Hepel, M. Multimodal Coupling of Optical Transitions and Plasmonic Oscillations in Rhodamine B Modified Gold Nanoparticles. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13* (3), 1131–1139.
- (68) Cheng, P. P. H.; Silvester, D.; Wang, G.; Kalyuzhny, G.; Douglas, A.; Murray, R. W. Dynamic and Static Quenching of Fluorescence by 1-4 Nm Diameter Gold Monolayer-Protected Clusters. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110* (10), 4637–4644.
- (69) Fraiji, L. K.; Hayes, D. M.; Werner, T. C. Static and Dynamic Fluorescence Quenching Experiments for the Physical Chemistry Laboratory. *J. Chem. Educ.* **1992**, *69* (5), 424.
- (70) Dulkeith, E.; Morteani, A. C.; Niedereichholz, T.; Klar, T. A.; Feldmann, J.; Levi, S. A.; van Veggel, F. C. J. M.; Reinhoudt, D. N.; Möller, M.; Gittins, D. I. Fluorescence Quenching of Dye Molecules near Gold Nanoparticles: Radiative and Nonradiative Effects. *Phys. Rev. Lett.* **2002**, *89* (20), 203002.
- (71) Li, D.; Li, D.-W.; Li, Y.; Fossey, J. S.; Long, Y.-T. Cyclic Electroplating and Stripping of Silver on Au@SiO₂ Core/shell Nanoparticles for Sensitive and Recyclable Substrate of Surface-Enhanced Raman Scattering. *J. Mater. Chem.* **2010**, *20* (18), 3688.
- (72) Senapati, D.; Dasary, S. S. R.; Singh, A. K.; Senapati, T.; Yu, H.; Ray, P. C. A Label-Free Gold-Nanoparticle-Based SERS Assay for Direct Cyanide Detection at the Parts-per-Trillion Level. *Chem. - A Eur. J.* **2011**, *17* (30), 8445–8451.
- (73) Conde, J.; Ambrosone, A.; Sanz, V.; Hernandez, Y.; Marchesano, V.; Tian, F.; Child, H.; Berry, C. C.; Ibarra, M. R.; Baptista, P. V.; et al. Design of Multifunctional Gold Nanoparticles for in Vitro and in Vivo Gene Silencing. *ACS Nano* **2012**, *6* (9), 8316–8324.
- (74) Darbha, G. K.; Ray, A.; Ray, P. C. Gold Nanoparticle-Based Miniaturized Nanomaterial Surface Energy Transfer Probe for Rapid and Ultrasensitive Detection of Mercury in Soil, Water, and Fish. *ACS Nano* **2007**, *1* (3), 208–214.