

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ

ESCUELA DE POSGRADO



Evaluación de nanopartículas de plata estabilizadas con ligandos sulfurados como sensores de Hg (II) en muestras de agua

TESIS PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN QUÍMICA

Autor

JORGE DAVID ROJAS CÁRDENAS

Asesor

DR. YVES PAUL COELLO DE LA PUENTE

San Miguel, 2019

Resumen

El mercurio es uno de los metales pesados más tóxicos que existen y se encuentra ampliamente distribuido en el medio ambiente ya que puede ser encontrado en el agua, el aire y el suelo. El mercurio no es biodegradable, por lo que permanece en los diversos ecosistemas y se acumula en diversas especies marinas. El mercurio es ampliamente utilizado en la minería aurífera informal e ilegal en nuestro país, cuyos efluentes son vertidos en los ríos dejando expuesta a la población y el medio ambiente ante este contaminante. Entre las diferentes formas de mercurio, el Hg^{2+} es la forma más común y estable, debido a su gran solubilidad en agua. Debido a la presencia de microorganismos en los sistemas acuáticos, el mercurio inorgánico es convertido en metil mercurio, sustancia altamente tóxica para los organismos vivos.

Comúnmente, para el análisis de mercurio se emplean técnicas como la espectrometría de absorción atómica de llama y la espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente, que presentan excelentes límites de detección, pero requieren de tiempos largos de preparación de muestra e instrumentación especializada y costosa. Por ello, en los últimos años se han buscado metodologías alternativas para la detección de mercurio. Dentro de los nuevos avances tecnológicos y científicos han surgido investigaciones sobre el uso de nanopartículas de metales nobles (plata y oro) como sensores colorimétricos debido a la banda de resonancia plasmónica de estas nanopartículas que aparece en la región UV-Visible del espectro electromagnético. Este nuevo enfoque se presenta como una alternativa interesante, debido a los bajos costos de producción, su capacidad de brindar una respuesta analítica rápida y confiable, junto con el empleo de una instrumentación más accesible como los espectrofotómetros UV-Vis. Además, este nuevo enfoque permite la adaptación de los nuevos sistemas para poder contar con dispositivos portátiles que permitan realizar mediciones *in situ*.

En el presente trabajo, se han sintetizado AgNPs esféricas y se han caracterizado mediante microscopía electrónica de transmisión y espectrofotometría UV-Vis. Además, se ha implementado y optimizado un protocolo de funcionalización para las AgNPs con los ligandos sulfurados cisteamina y cisteína, con el fin de detectar Hg^{2+} en agua.

Finalmente, se ha optimizado un método colorimétrico de cuantificación de Hg^{2+} en agua empleando las AgNPs funcionalizadas. Para el sensor de AgNPs-CyNH₂, se logró obtener un límite de detección de 108 nM con un tiempo de incubación de 2 min, mientras que para el sensor de AgNPs-Cy, se obtuvo un límite de detección de 441 nM con un tiempo de incubación de 20 min.

Abstract

Mercury is one of the most toxic heavy metals that exists and is widely distributed in the environment and can be found in water, air and soil. Mercury is not biodegradable, so it remains in diverse ecosystems and accumulates in various marine species. In our country, mercury is widely used in informal and illegal gold mining. The resulting effluents are discharged into rivers, exposing the population and the environment to this pollutant. Among the different forms of mercury, Hg^{2+} is the most common and stable form, due to its great solubility in water. Due to the presence of microorganisms in aquatic systems, inorganic mercury is converted into methyl mercury, a substance highly toxic to living organisms.

Commonly, the analysis of mercury is made by techniques such as flame atomic absorption spectrometry and inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) are used. They have excellent limits of detection, but they require long sample preparation times and specialized and costly instrumentation. For this reason, alternative methodologies for the detection of mercury have been sought in recent years. Among the new technological and scientific advances, the use of noble metal nanoparticles (silver and gold) as colorimetric sensors has emerged. These sensors exploit the localized surface plasmon band of the nanoparticles, which appears in the UV-Visible region of the electromagnetic spectrum. This new approach is presented as an interesting alternative, due to the low production costs, its ability to provide a rapid and reliable analytical response, together with the use of more accessible instrumentation such as UV-Vis spectrophotometers. In addition, this new approach allows the adaptation of the new systems in order to have portable devices that allow on-site measurements.

In the present research work, spherical AgNPs have been synthesized and characterized by transmission electron microscopy and UV-Vis spectrophotometry. A functionalization protocol has been implemented and optimized for AgNPs with the sulfuric ligands cysteamine and cysteine in order to detect Hg^{2+} in water.

Finally, a colorimetric method for quantify Hg^{2+} in water using the functionalized AgNPs has been optimized. For the AgNPs-CyNH₂ sensor, it was possible to obtain a detection limit of 108 nM with an incubation time of 2 min, while for the AgNPs-Cy sensor, a detection limit of 441 nM was obtained with an incubation time of 20 min.

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a mis padres y toda mi familia, porque siempre me han apoyado y confiado en mí, por ser mi soporte y por alentarme a alcanzar nuevas metas y poder cumplir con los objetivos que me propongo. Gracias a mi madre, Margarita, por todos sus sacrificios e incontables esfuerzos para que pueda cumplir mis sueños y aspiraciones. A mi padre y a mi hermano por su apoyo incondicional, por estar siempre dispuestos a escuchar y regalarme una sonrisa amistosa en el momento preciso.

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 ha sido indispensable para la culminación de la tesis. Por su paciencia, buena disposición al responder mis preguntas y por las explicaciones brindadas a lo largo de este trabajo.

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 Dra. Yulán Hernández y Dra. Betty Galarreta quienes, con su carisma y sus grandes ganas de compartir sus conocimientos y experiencia, implantaron en mí la curiosidad por el “mundo nano” a través del curso de Introducción a la Nanoquímica.

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 su buen humor y disposición que me permitieron llevar a cabo un buen trabajo en el laboratorio.

A Glibver y Lorena; por sus sugerencias, disposición y ayuda durante el trabajo en el laboratorio.

Índice general

Índice general	i
Índice de figuras	iv
Índice de tablas	vi
Abreviaturas.....	vii
1. Introducción	1
2. Objetivos	3
2.1. Objetivo general.....	3
2.2. Objetivos específicos	3
3. Marco teórico	4
3.1. Nanopartículas	4
3.1.1. Características únicas de las nanopartículas.....	4
3.1.2. Resonancia de plasmón superficial	5
3.1.3. Síntesis de nanopartículas	6
3.1.3.1. Síntesis de nanopartículas en fase líquida	6
3.2. Nanopartículas de plata.....	7
3.2.1. Síntesis de nanopartículas de plata.....	7
3.2.2. Nanopartículas de plata como sensores colorimétricos.....	9
3.2.3. Sensores colorimétricos de mercurio basados en AgNPs.....	10
3.3. Mercurio.....	11
3.3.1. Características y propiedades químicas.....	11
3.3.2. Mercurio como contaminante del medio ambiente y sus efectos sobre la salud.....	11
3.3.3. Técnicas de cuantificación de mercurio en agua.....	13
4. Hipótesis.....	13
5. Parte experimental.....	13
5.1. Reactivos, materiales y equipos.....	13
5.1.1. Reactivos y materiales.....	13
5.1.2. Equipos.....	14
5.2. Procedimientos.....	15
5.2.1. Síntesis de nanopartículas de plata.....	15
5.2.2. Protocolo de funcionalización de las AgNPs con cisteamina	15

5.2.3. Protocolo de funcionalización de las AgNPs con cisteína	16
5.2.4. Caracterización de las AgNPs mediante espectroscopía UV-Vis	16
5.2.5. Caracterización de las AgNPs mediante microscopía TEM	16
5.2.6. Detección de Hg ²⁺ con las AgNPs-CyNH ₂	16
5.2.7. Detección de Hg ²⁺ con las AgNPs-Cy	17
5.2.8. Estudio de interferentes	17
5.2.9. Detección de Hg ²⁺ en muestras de agua reales	18
6. Resultados	18
6.1. Síntesis y caracterización de AgNPs empleando espectroscopia UV-Vis.....	18
6.1.1. Caracterización de AgNPs mediante espectrometría UV-Vis.....	18
6.1.2. Microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	20
6.2. Detección de Hg ²⁺ con AgNPs funcionalizadas con cisteamina	20
6.2.1. Ensayos preliminares	20
6.2.2. Optimización del ensayo de detección de Hg ²⁺	24
6.2.2.1. Evaluación de la cantidad de ligando	24
6.2.2.2. Efecto de la cantidad de AgNPs-CyNH ₂ en la detección de Hg ²⁺	24
6.2.2.3. Evaluación del tiempo de incubación para la detección de Hg ²⁺	25
6.2.3. Curva de calibración de Hg ²⁺ para el sensor de AgNPs-CyNH ₂ mediante espectrofotometría UV-Vis	26
6.2.4. Evaluación de la detección de Hg ²⁺ en presencia de iones interferentes..	27
6.2.5. Ensayo de detección de Hg ²⁺ en muestras de agua reales	28
6.3. Evaluación de detección de Hg ²⁺ con AgNPs funcionalizadas con cisteína ...	29
6.3.1. Ensayos preliminares	29
6.3.2. Optimización del ensayo de detección de Hg ²⁺	31
6.3.2.1. Evaluación de la cantidad de ligando	31
6.3.2.2. Efecto de la cantidad de AgNPs-Cy en la detección de Hg ²⁺	32
6.3.2.3. Evaluación del tiempo de incubación para la detección de Hg ²⁺	32
6.3.3. Curva de calibración de Hg ²⁺ para el sensor de AgNPs-Cy mediante espectrofotometría UV-Vis	33
6.3.4. Evaluación de la detección de Hg ²⁺ en presencia de iones interferentes	33
6.3.5. Ensayo de detección de Hg ²⁺ en muestras de agua reales.....	34
7. Discusión de resultados	35
7.1. Síntesis y caracterización de AgNPs.....	35
7.2. Funcionalización de las AgNPs con los ligandos sulfurados cortos.....	35

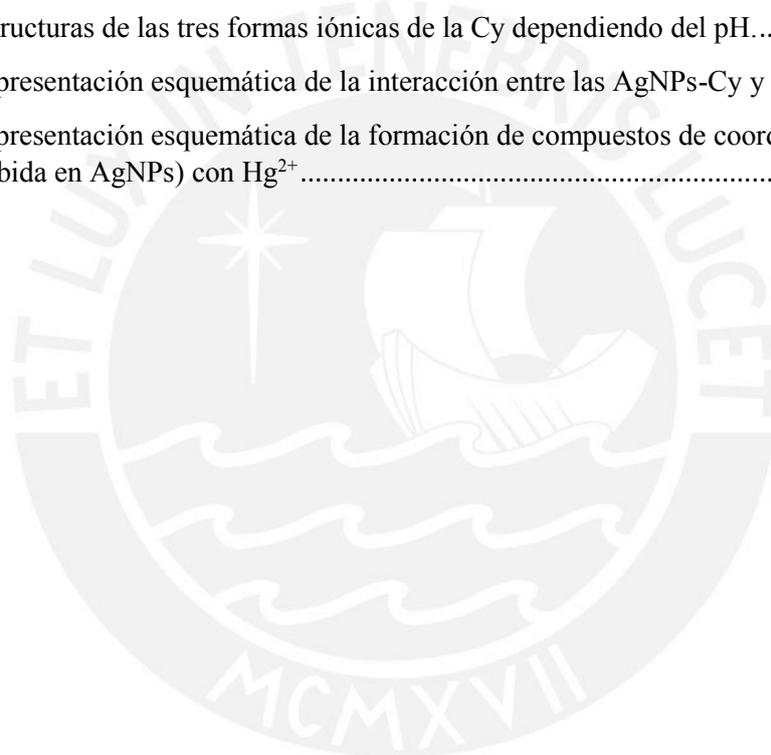
7.3. Detección de Hg ²⁺ con AgNPs funcionalizadas	36
7.4. Estudio de interferentes y detección de Hg ²⁺ en muestras de aguas reales	38
8. Conclusiones y recomendaciones.....	39
9. Referencias bibliográficas.....	40



Índice de figuras

Figura 1: Copa de Lycurgus	4
Figura 2: Esquema de la oscilación del plasmón para una esfera	5
Figura 3: Esquema de formación de AgNPs por el método de reducción química a partir de una solución de AgNO_3	8
Figura 4: Estructura química de a) cisteína y b) cisteamina.....	9
Figura 5: Esquema del mecanismo de sensado de AgNPs-CyNH ₂ ante Hg ²⁺	11
Figura 6: Esquema del proceso de síntesis de las AgNPs.	15
Figura 7: Fotografías de a) AgNPs antes de ser funcionalizadas b) AgNPs-CyNH ₂ (izquierda) y AgNPs-Cy (derecha).	18
Figura 8: Espectro UV-Vis de AgNPs.	18
Figura 9: Espectro UV-Vis de AgNPs-CyNH ₂	19
Figura 10: Espectro UV-Vis de AgNPs-Cy.	19
Figura 11: Imágenes TEM de las AgNPs-CyNH ₂ a) escala de 100 nm y b) escala de 200 nm. 20	
Figura 12: Histograma de la distribución del diámetros de las AgNPs-CyNH ₂ obtenidas mediante las imágenes TEM.	20
Figura 13: Espectro UV-Vis de AgNPs-CyNH ₂ _SL, AgNPs-CyNH ₂ _SL + 0 μM Hg ²⁺ , AgNPs-CyNH ₂ _SL + 10 μM Hg ²⁺	21
Figura 14: Espectro UV-Vis de AgNPs-CyNH ₂ _L, AgNPs-CyNH ₂ _L + 0 μM Hg ²⁺ , AgNPs-CyNH ₂ _L + 10 μM Hg ²⁺	21
Figura 15: Espectros UV-Vis de AgNPs expuestas a diferentes concentraciones de Ca.	22
Figura 16: Espectros UV-Vis de AgNPs-CyNH ₂ expuestas a diferentes concentraciones de Ca.	22
Figura 17: Espectro UV-Vis de las AgNPs a pH 4, 6 y 8.	23
Figura 18: Espectro UV-Vis de las AgNPs-CyNH ₂ a pH 4, 6 y 8.	23
Figura 19: Espectros UV-Vis de AgNPs-CyNH ₂ con diferentes cantidades de ligando.....	24
Figura 20: Gráfica del efecto de la cantidad de AgNPs-CyNH ₂ x10 para la detección de Hg ²⁺ . 25	
Figura 21: Gráficos de concentración de Hg ²⁺ versus extinción, para los tiempos 5, 10, 20 y 30 min.	25
Figura 22: Gráfica de concentración de Hg ²⁺ versus extinción, para los tiempos 1, 3 y 5 min.. 26	
Figura 23: Curva de calibración de Hg ²⁺ para el sensor de AgNPs-CyNH ₂ x10.....	27
Figura 24: Diagrama de barras de diferentes sales utilizadas como interferentes en la detección de Hg ²⁺	28
Figura 25: Comparación de la respuesta a la detección de Hg ²⁺ por parte del sensor AgNPs-CyNH ₂ en muestras de agua reales.....	29
Figura 26: Espectros de AgNPs-Cy a pH 6, 7 y 8.	29
Figura 27: Espectro UV-Vis de AgNPs interactuando con Hg ²⁺ en presencia de buffer pH 8. . 30	

Figura 28: Espectro UV-Vis de AgNPs-Cy_SL frente a 0 μM Hg^{2+} y 2 μM Hg^{2+}	30
Figura 29: Espectro UV-Vis de AgNPs-Cy_L interactuando frente a 0 μM Hg^{2+} y 2 μM Hg^{2+}	31
Figura 30: Espectros de AgNPs-Cy con diferentes cantidades de ligando.	31
Figura 31: Gráfica del efecto de la cantidad de AgNPs-Cyx10 en la detección de Hg^{2+}	32
Figura 32: Gráficos de concentración de Hg^{2+} versus absorbancia, para los tiempos 5, 10, 15 y 20 min.	32
Figura 33: Curva de calibración de Hg^{2+} para el sensor de AgNPs-Cyx10.	33
Figura 34: Diagrama de barras de diferentes sales utilizadas como interferentes en la detección de Hg^{2+}	34
Figura 35: Comparación de la respuesta a la detección de Hg^{2+} por parte del sensor AgNPs-Cy en muestras de agua reales.	34
Figura 36: Estructuras de las tres formas iónicas de la Cy dependiendo del pH.	37
Figura 37: Representación esquemática de la interacción entre las AgNPs-Cy y el Hg^{2+}	37
Figura 38: Representación esquemática de la formación de compuestos de coordinación entre cisteína (absorbida en AgNPs) con Hg^{2+}	38



Índice de tablas

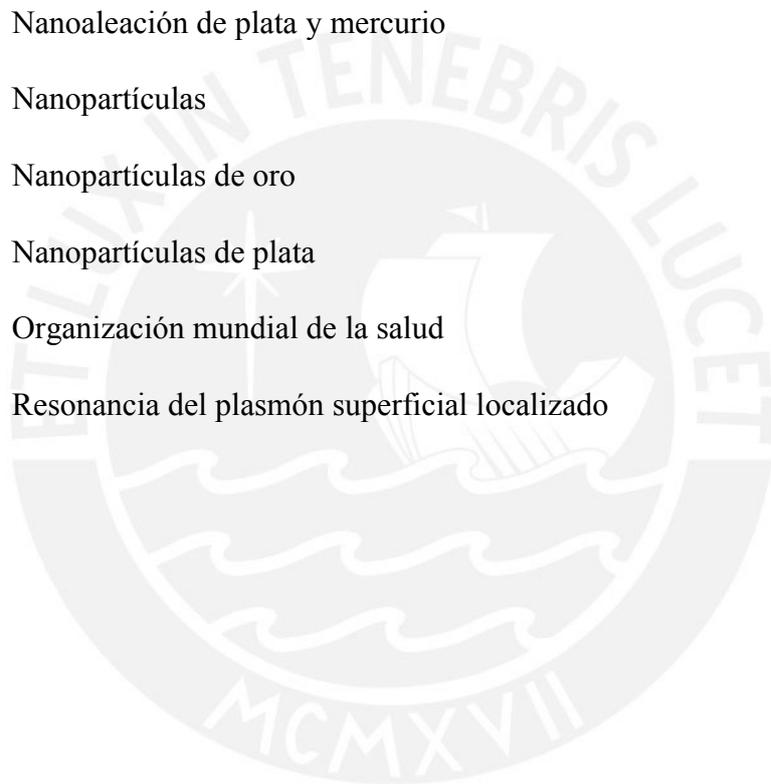
Tabla 1: Lista de reactivos empleados. 13

Tabla 2: Datos de caracterización de las aguas de manantial..... 28



Abreviaturas

EPA	Agencia de protección ambiental
CyNH ₂	Cisteamina
Cy	Cisteína
UV-Vis	Espectroscopía Ultravioleta-Visible
LOD	Límite de detección
Ag@Hg	Nanoaleación de plata y mercurio
NPs	Nanopartículas
AuNPs	Nanopartículas de oro
AgNPs	Nanopartículas de plata
OMS	Organización mundial de la salud
LSPR	Resonancia del plasmón superficial localizado



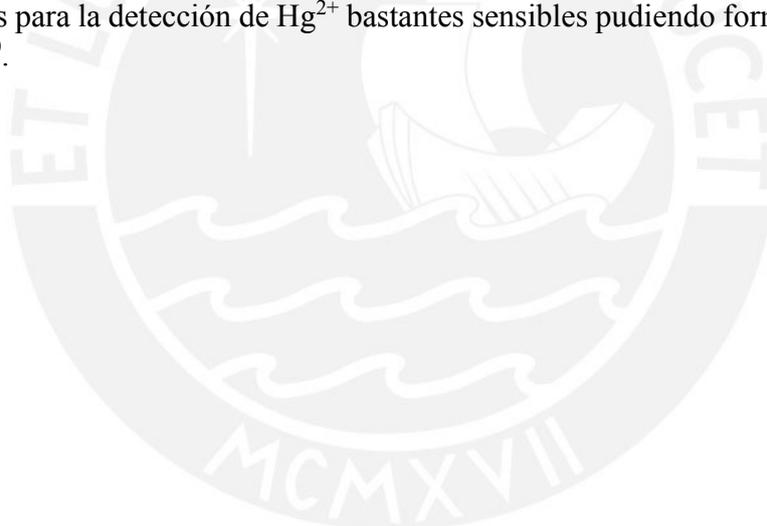
1. Introducción

En esta era de nuevas tecnologías y de globalización, los seres humanos aún no son capaces de tomar en consideración el camino por el que se dirige el planeta, pues las cantidades de residuos que se producen están llegando a cantidades inimaginables. Por otro lado, en el desarrollo de las actividades productivas y extractivas que son el motor de la economía en términos generales, como la minería, se emplean sustancias químicas tóxicas y peligrosas que vienen contaminando grandes cantidades de agua como parte del proceso. Uno de los grandes problemas ambientales es la contaminación por metales pesados¹ que ha tomado una gran importancia en los últimos años en nuestro país, debido a la falta de conciencia de la relevancia de los recursos hídricos y la necesidad de preservarlos. Por este motivo se ha convertido en un tema de interés para la comunidad científica, que busca resolver estos problemas, ya sea con sistemas que permitan una rápida detección o con nuevos procesos de remediación. Muchas veces la vigilancia y el control de la presencia de los metales pesados no se monitorea en las zonas rurales que mayormente se encuentran expuestas a estos contaminantes, debido a su ubicación geográfica o al desinterés de las autoridades competentes, por lo que los pobladores de estas zonas suelen tener mayor exposición a estos metales. Dentro de los iones de metales pesados, los más tóxicos para la salud de los seres humanos y el medio ambiente son As^{3+} , Cr^{6+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} y Hg^{2+} , aún a nivel de trazas^{1,2}.

El mercurio ha sido muy estudiado como un contaminante ambiental durante varias décadas, debido a que es una especie bioacumulativa, está considerada el metal pesado más tóxico, y se encuentra en todas partes del medio ambiente y la biota¹⁻⁴. El mercurio es extremadamente tóxico en todos sus estados de oxidación, a pesar de las diferencias de estabilidad y la posibilidad de interconversión redox⁵⁻⁷, pues vapores de mercurio elemental son emitidos a la atmósfera y son eventualmente oxidados a Hg^{2+} . De las diferentes formas, el Hg (II) es la más común y estable como contaminante, y debido a su solubilidad en agua, es capaz de contaminar grandes volúmenes de agua. Cuando el mercurio es introducido en los ecosistemas acuáticos, este puede ingresar a la cadena alimenticia marina y acumularse en niveles más altos. Además, algunos microorganismos presentes en el agua que convierten el mercurio inorgánico en metil mercurio, el cual es neurotóxico⁸. Al ingresar en la cadena alimenticia, los riesgos para la salud pueden ser devastadores, como daños neurológicos y al sistema nervioso, pérdida de visión y audición, e incluso la muerte. Además, se observaron daños a nivel del sistema gastrointestinal, hígado y riñones. Los niños fueron los más afectados y dependiendo del grado de exposición presentaban trastornos cognitivos y de movimiento, además en niños no natos debido al consumo de alimentos contaminados de madres en estado de gestación, se observó que nacían con distrofias severas entre otras dolencias². Existe una enfermedad que puede resultar mortal, denominada enfermedad de Minamata que se desarrolló en Japón por el año de 1956 debido a la llegada de la empresa Chisso a Minamata, conocida en la década de los 50 como *Nippon Nitrogen Fertilizer Corporation*, y producía acetaldehído que era utilizado en la producción de plásticos. Para la síntesis del acetaldehído se empleaba mercurio como catalizador y, posteriormente, los residuos eran vertidos al mar donde el mercurio era convertido en metil mercurio e ingresaba a la cadena alimenticia marina. En el año 2010, 2771 personas padecían la enfermedad de Minamata, pero más de 40000 tenían síntomas más leves. En la bahía de Minamata, la concentración media de mercurio era de 25 mg/g de sedimento en un área de unos dos kilómetros

cuadrados⁹. A pesar de ser concentraciones bajas, al ser absorbidas en pequeña cantidad durante muchos años pueden provocar efectos nocivos. Por eso, el monitoreo de los niveles de Hg^{2+} en los ecosistemas acuáticos incluso a bajas concentraciones resulta ser muy importante.

Hasta la fecha existe una variedad de métodos de detección de Hg^{2+} que han sido reportados en la literatura, entre los más comunes esta la espectroscopia de absorción atómica. Estos métodos proporcionan límites de detección (LODs) satisfactorios a nivel de ppb, por debajo del límite máximo exigido por la EPA de 2 ppb (10 nM) para Hg^{2+} en agua potable, sin embargo, realizan operaciones sofisticadas que consumen mucho tiempo, tienen costos elevados, requieren equipos complicados y personal altamente preparado, por lo que no son adecuados para realizar monitoreo en campo. Por lo tanto, sería deseable poder contar con sistemas de detección selectiva de Hg^{2+} que sean más simples, rápidos, sensibles y además rentables. Es así que en las últimas décadas las AgNPs y AuNPs han atraído una gran atención por parte de la comunidad científica debido a su propiedad distintiva de la resonancia del plasmón de superficie localizado observada mediante espectrofotometría UV-Vis, que es una técnica relativamente sencilla que no requiere instrumentación sofisticada. Las NPs, a diferencia de los colorantes comunes presentan mejores características de estabilidad, selectividad y viabilidad para ser muy versátiles, lo que permite que estas nanopartículas se utilicen como sensores colorimétricos para la detección de Hg^{2+} bastantes sensibles pudiendo formar amalgamas o agregando¹⁰.



2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Preparar y evaluar sensores colorimétricos basados en AgNPs para la detección de mercurio (Hg^{2+}) en agua.

2.2. Objetivos específicos

- Sintetizar AgNPs y caracterizarlas mediante espectrofotometría UV-Vis.
- Funcionalizar las AgNPs con los ligandos cisteamina y cisteína, y caracterizarlas.
- Desarrollar un protocolo de cuantificación de mercurio (Hg^{2+}) para cada sensor en estudio y comparar sus respuestas.



3. Marco teórico

3.1. Nanopartículas

Las nanopartículas (NPs) pueden ser definidas como cualquier partícula microscópica cuyo tamaño de al menos una de sus dimensiones es menor a 100 nanómetros (nm) y se comporta como una unidad completa en términos de sus propiedades de transporte, funcionales y estructurales, y su interacción con otras especies y su entorno¹¹. El término nanopartícula se viene empleando mucho en los últimos años. Sin embargo, las NPs en sí mismas, ya existen desde hace mucho tiempo antes de que el término fuera acuñado. Por ejemplo, las ventanas de la época medieval tienen dispersas NPs de oro y plata en la matriz de vidrio, lo que le permite tener diferentes colores tan llamativos. El color de estas NPs depende del material y de su tamaño, debido a la absorción de la luz visible por el metal. Otro ejemplo muy difundido se encuentra en el siglo IV, cuando los fabricantes romanos de vidrio elaboraron la famosa copa de Lycurgus. Sin duda no sabían que las NPs metálicas finamente dispersas eran el origen de sus características ópticas intrigantes. Cuando se irradia desde el exterior, la copa aparece verde a partir de la luz reflejada, mientras que, si se irradia desde el interior, aparece un color rojo rubí debido a la luz transmitida (figura 1). Durante los siglos siguientes, el oro y la plata en su forma coloidal se usaron para fabricar vidrios de colores o porcelana¹².



Figura 1: Copa de Lycurgus.
(Tomada de <https://terraantiquae.com/m/blogpost>)

3.1.1. Características únicas de las nanopartículas

Dentro de las características de las NPs se encuentran la reactividad química y posibilidad de autoensamblaje mediante reconocimiento molecular. Estas características de las NPs dan lugar a propiedades únicas debido a su tamaño, que es menor que las dimensiones críticas que caracterizan muchos fenómenos físicos, como la longitud de difusión térmica, la longitud de onda de la luz y el camino libre promedio de los electrones. Cuando una dimensión es inferior a estas longitudes críticas, es probable que se produzca un nuevo comportamiento físico o químico, como propiedades catalíticas o efectos cuánticos. Los materiales basados en NPs pueden presentarse en muchas formas diferentes, como polvos secos, suspensiones de NPs, entre otras.¹¹

Por otro lado, la estructura electrónica de las NPs es muy dependiente del tamaño, pues los niveles de energía electrónica no son continuos como en el material a escala macroscópica, sino discretos debido al confinamiento del electrón en la función de onda. Además, debido a la presencia de la brecha energética en NPs individuales, las propiedades tales como la conductividad eléctrica y la susceptibilidad magnética exhiben efectos de tamaño cuántico. Debido al tamaño de las NPs también se ven afectados el comportamiento de la superficie, la solubilidad, las propiedades químicas, eléctricas, magnéticas y ópticas¹¹.

Para el desarrollo del presente trabajo son de particular importancia: a) el comportamiento de la superficie de las NPs, ya que las NPs exhiben una actividad superficial muy alta las cuales las vuelve muy reactivas, que puede ocasionar que reaccionen con las especies del medio y se obtengan productos indeseados, o que se aglomeren, es decir, formen partículas más grandes. b) la solubilidad es una característica muy importante para las NPs en suspensión, pues los átomos de la superficie de las NPs se encuentran débilmente unidos, por lo que pueden separarse y disolverse al interactuar con el medio. Debido a esta circunstancia el núcleo de las NPs en suspensión es cristalino en comparación con su superficie que es más amorfa. Para los procesos en medios líquidos es muy común observar la floculación de las NPs, debido a su gran reactividad y poca dispersión entre las NPs que lleva a la aglomeración por su gran energía superficial. c) propiedades químicas, debido al incremento de la reactividad por la reducción de su tamaño que incrementa el área superficial. Además, de los cambios en la estructura electrónica que surgen debido al confinamiento cuántico que pueden otorgar propiedades catalíticas inusuales en estas partículas, completamente diferentes a aquellas en el material en tamaño macroscópico. d) las propiedades ópticas de las NPs son diferentes al material macroscópico, pues cuando las partículas tienen tamaños en la escala de nanómetros propiedades de excitación pueden aparecer¹¹. Para las NPs metálicas de los metales nobles, el espectro de extinción se encuentra en la región visible y la banda característica de estas NPs, se denomina Resonancia de Plasmón de Superficie Localizada (LSPR- *Localized Surface Plasmon Resonance*), que dependiendo del tamaño y forma de las NPs las soluciones exhiben coloraciones variadas.

3.1.2. Resonancia de plasmón superficial

La LSPR es el resultado de la interacción de la luz con partículas mucho más pequeñas que la longitud de onda incidente. Cuando una NP es irradiada por la luz, ocurre un desplazamiento de la nube de electrones de conducción en sentido contrario al campo eléctrico aplicado, provocando una oscilación coherente de los electrones con respecto al núcleo, que continúa debido a la fuerza de atracción eléctrica entre los electrones y el núcleo¹². Es decir, al interactuar las NPs con la luz, provoca una frecuencia de oscilación de la nube de electrones que da lugar a la LSPR. Esta frecuencia de oscilación está determinada por cuatro factores: la densidad de los electrones, la masa efectiva de electrones, el tamaño y forma de la distribución de carga¹³. Además, la ubicación de la LSPR depende de la forma y el tamaño de las NPs. El proceso de interacción de la luz con una NP esférica se representa esquemáticamente en la figura 2.

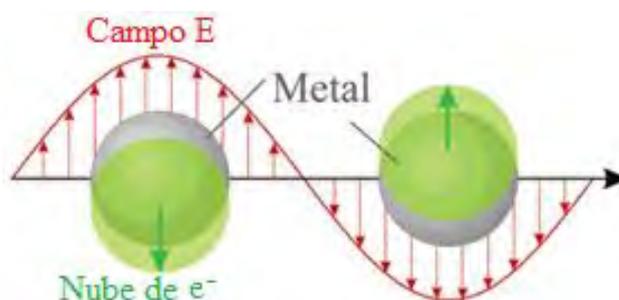


Figura 2: Esquema de la oscilación del plasmón para una esfera. Se muestra el desplazamiento de la nube de electrones de conducción en relación con los núcleos. Adaptado de Schatz¹⁴.

Mediante la detección de la LSPR de las NPs se han podido realizar diversas aplicaciones en el campo de las ciencias y ha permitido el desarrollo de nuevas instrumentaciones. Lamentablemente, solo algunos metales presentan LSPR, entre ellos los más estudiados son el oro y la plata debido a que son lo suficientemente estables químicamente y presentan su LSPR en la zona del UV-Vis-NIR.

3.1.3. Síntesis de nanopartículas

Existen dos procesos en la síntesis de las NPs, estos son la nucleación y el crecimiento. En la nucleación se forman los núcleos de las NPs, los cuales también son llamados semillas; este proceso puede llevarse de dos formas, de manera homogénea, cuando las semillas se forman de manera uniforme con una pequeña distribución de tamaños; de manera heterogénea, cuando existe la presencia de partículas en el medio o cuando comienzan a crecer las semillas en las paredes del contenedor, lo que genera NPs dispersas de diferentes tamaños. El proceso de nucleación puede llevarse a cabo de una u otra forma dependiendo de ciertas consideraciones en la síntesis como son la velocidad de agitación, la forma de adición del reactivo y la uniformidad de la temperatura, entre otros factores¹¹.

El proceso de crecimiento puede llevarse a cabo de tres formas: crecimiento homogéneo, maduración de Ostwald y agregación. Cuando el crecimiento se realiza de forma homogénea, las semillas van creciendo de manera uniforme obteniéndose NPs cuasi monodispersas, pues la mayoría de semillas van adicionando nuevos átomos de la solución disminuyendo la cantidad del reactivo en el medio hasta que este se termine; este proceso está controlado por la difusión y por las reacciones en la superficie de las NPs. En la maduración de Ostwald las NPs más pequeñas se disuelven y se depositan en las partículas más grandes. Mediante la maduración de Ostwald, es difícil obtener partículas monodispersas, pues se debe tener una solubilidad bastante alta de la fase sólida. Para el crecimiento por agregación, las partículas pequeñas o semillas inestables, debido a su gran área superficial y gran energía disponible, promueven la agregación de las semillas más pequeñas formando partículas grandes que son más estables. Además, la barrera para la agregación aumenta cuanto más grandes son las partículas, es decir, es menos probable que partículas más grandes se agreguen¹¹.

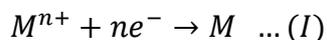
La capacidad de controlar el crecimiento de los núcleos determina si las partículas obtenidas serán de tamaño nanométrico o de tamaño micrométrico y qué tan amplia será la distribución del tamaño de partícula. Además del tamaño, la forma de las NPs también se verá afectada por las velocidades de los procesos de nucleación y crecimiento, sin embargo, estos procesos pueden controlarse modificando los parámetros de reacción como la concentración de los reactivos, la temperatura de síntesis, el pH y el poder reductor del agente reductor, entre otros¹⁴.

3.1.3.1. Síntesis de nanopartículas en fase líquida

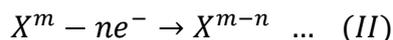
La síntesis en fase líquida es uno de los procesos más ampliamente difundido en la síntesis de NPs, debido a su gran flexibilidad para controlar los procesos de formación, además de ser la fase líquida un buen medio de dispersión y brindar las facilidades para trabajar con las NPs posteriormente. Sin embargo, los pasos de síntesis en fase líquida requieren de un control cuidadoso en la nucleación y crecimiento de las NPs, para obtener las NPs de tamaño y forma deseados. La síntesis en fase líquida presenta diversas variantes como

la reducción de sales metálicas, hidrólisis, precipitación, síntesis solvotérmica, entre otras. Es de principal interés para este trabajo de investigación el enfoque basado en la reducción de sales metálicas¹¹.

En el proceso de síntesis de NPs, la reducción de la sal metálica se puede expresar de manera general, como:



Por otro lado, debe haber un proceso de oxidación correspondiente de algunas especies X, tal que pueda ocurrir la transferencia de electrones.



Es necesario que el potencial de reducción del par metal – ion de la reacción I sea mayor que el de la reacción II para que la reacción se lleve a cabo¹¹. El precursor metálico tiene un efecto importante en el comportamiento de las NPs, así como el agente reductor que regulará la velocidad de formación de las NPs, debido a que la reacción de ambas especies es un paso importante para obtener las NPs de forma y tamaño deseados.

3.2. Nanopartículas de plata

Las nanopartículas de plata (AgNPs) individuales interactúan de manera más eficiente con la luz que cualquier cromóforo orgánico o inorgánico conocido de la misma dimensión. Por otro lado, entre las NPs de metales nobles, las AgNPs presentan un coeficiente de extinción molar que es aproximadamente 100 veces mayor que las nanopartículas de oro (AuNPs) del mismo tamaño, es decir, que las AgNPs presentan mejor brillo óptico (da mejor visibilidad) y tienen mayor sensibilidad⁸. Sin embargo, las AuNPs son muy estables debido a su inercia química y su resistencia a la oxidación, a diferencia de las AgNPs que son menos estables.

3.2.1. Síntesis de nanopartículas de plata

Existen diferentes métodos para la obtención de AgNPs tales como: reducción de sales metálicas, reducción fotoquímica y radioquímica, irradiación con microondas, método sol-gel y mediante la reacción de Tollens, entre muchos otros¹⁵⁻²⁰. En la síntesis de AgNPs se buscan métodos prácticos, simples y que permitan un buen control del tamaño y forma de las NPs, para así obtener NPs lo más monodispersas posibles, pudiendo así mantener sus propiedades constantes, es decir, que sean reproducibles.

Uno de los procesos de síntesis más simples es el de reducción de sales metálicas en medio acuoso, el cual de manera práctica se puede llevar a cabo mediante la presencia de tres componentes: el precursor metálico, el agente reductor y un agente estabilizador²¹. El mecanismo del proceso para la formación de AgNPs se muestra en la figura 3.

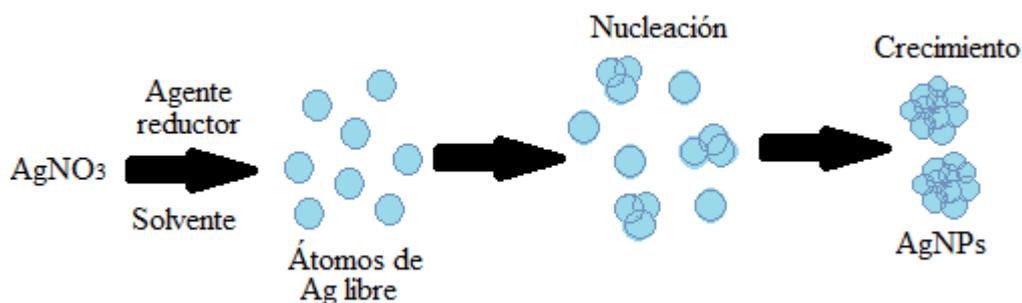


Figura 3: Esquema de formación de AgNPs por el método de reducción química a partir de una solución de AgNO_3 . Adaptado de Monge²¹.

Uno de los primeros métodos de síntesis de AgNPs es el de Lee y Meisel²², que fue adaptado de la síntesis de AuNPs, en el que se lleva a cabo la reducción del nitrato de plata con citrato, el cual sirve como agente reductor y estabilizador. Sin embargo, este método produce NPs de una amplia distribución de tamaños de entre 20 y 600 nm, además de una diversidad de formas entre poliedros, platos y esferas. Para mejorar este enfoque se han realizado diversas modificaciones para controlar las formas, siendo una de ellas el cambiar el pH de la solución para controlar los diferentes estados de protonación del ion citrato^{23,24}. Por otro lado, Creighton y col.²⁵ desarrollaron un proceso de síntesis para obtener AgNPs de aproximadamente 10 nm con una distribución de tamaño estrecha, mediante la adición de la solución de nitrato de plata a una solución fría de borohidruro de sodio que es el agente reductor. Además, mediante el control y regulación de los parámetros de síntesis se ha mejorado el proceso de síntesis de las AgNPs. Sin embargo, debido a que las AgNPs son bastantes susceptibles a la oxidación, además del inherente proceso de agregación producto de la gran reactividad y alta energía superficial de las NPs, se resalta la importancia de los agentes estabilizadores que se adhieren a la superficie de las NPs, median el crecimiento y agregación de las mismas además de pasivar su superficie y estabilizarlas estéricamente en solución^{11,15}. En algunos casos la agregación se puede evitar debido a la doble capa eléctrica que se forma alrededor de las NPs en la síntesis. Sin embargo, cuando las NPs se exponen a fuerzas iónicas mayores, es necesario el uso de agentes estabilizadores como por ejemplo surfactantes, polímeros o dendrímeros, que impidan la agregación de las NPs.

Por otro lado, para que las AgNPs sean aplicables en ensayos analíticos deben ser capaces de ser específicas y selectivas, además de estables. Esto se logra mediante la unión de moléculas específicas en la superficie de las AgNPs tales como ligandos orgánicos que presentan grupos funcionales como tioles, carboxilatos, fosfinas oxidadas, aminas^{19,20,26,27}, entre muchas otras que se adecuan para la detección de un analito en particular.

Una variante del método de reducción de sales metálicas para la síntesis de AgNPs, adiciona el agente estabilizador en el paso de reducción ya que algunos investigadores indican que esto ayuda a controlar la distribución de tamaños. Sin embargo, en algunos procesos esto puede dar lugar a la aparición de partículas anisotrópicas debido a las diferentes afinidades de los ligandos al ser expuestos a las diferentes caras de las NPs¹⁵. No obstante, las NPs pueden ser recubiertas con las moléculas deseadas después de la síntesis para facilitar su interacción química. Por ello, para estabilizar y dotar a las AgNPs de afinidad hacia el Hg^{2+} , en este trabajo de investigación se emplearon como agentes

estabilizadores moléculas pequeñas que contenían grupos sulfurados (tioles), como la cisteamina y la cisteína, cuyas estructuras se muestran en la figura 4. La cisteína es un aminoácido y como tal posee un punto isoeléctrico (pH en el cual el número de cargas positivas es igual al número de cargas negativas) que tiene un valor de 5.07. Los valores de pK_a para el grupo carboxilo es de 1.96, para el grupo amino es de 8.18 y para el grupo tior es de 10.28²⁸. Estas moléculas presentan gran afinidad hacia las AgNPs debido a la fuerte interacción de los átomos de azufre con la plata, ya que estos grupos tienen la fuerza suficiente para desplazar a los iones que se encuentren en la superficie de las AgNPs y hacerlas más estables. Además, en este caso las interacciones específicas, llevan a la formación de enlaces cuasi covalentes entre las AgNPs y los compuestos sulfurados.

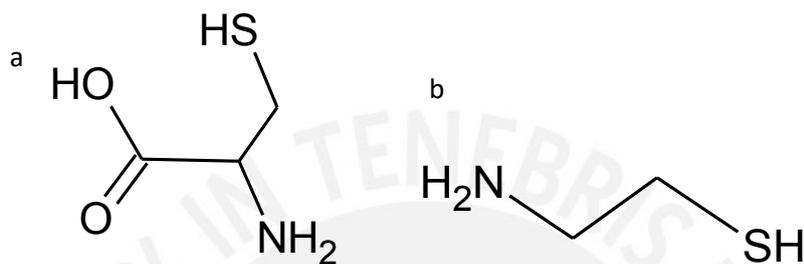


Figura 4: Estructura química de a) cisteína y b) cisteamina.

3.2.2. Nanopartículas de plata como sensores colorimétricos

Los métodos colorimétricos basados en AgNPs han sido extensamente usados para la detección rápida de diversos analitos tales como moléculas orgánicas, toxinas, fármacos e iones metálicos, pues no requieren protocolos complicados ni extensos, y superan algunas limitaciones de los métodos más convencionales²⁹. Las propiedades ópticas de las AgNPs, son dependientes en gran medida del tamaño, la forma y la agregación de NPs en solución y están controladas por la LSPR.

Existen diversos tipos de sensores colorimétricos basados en AgNPs, en el presente trabajo se ha prestado especial atención a las aplicaciones de AgNPs como sistemas colorimétricos para la detección de iones metálicos pesados y tóxicos principalmente. Comúnmente, en la detección de iones metálicos se pueden aplicar diversos métodos tales como la espectroscopía de absorción atómica², espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente³² y cristales de cuarzo piezoeléctricos, que permiten la detección a nivel de trazas³³, entre otros. Aunque las técnicas anteriores ofrecen límites de detección muy bajos, la mayoría de estos métodos consumen mucho tiempo, emplean equipamiento sofisticado y el procedimiento no es lo suficientemente simple como para ser utilizado en el análisis *in situ*.

Por otro lado, los ensayos colorimétricos basados en AgNPs pueden ser muy eficientes y sensibles para la detección de iones metálicos en monitoreo ambiental. Teniendo en cuenta este enfoque se han desarrollado una variedad de sensores basados en AgNPs para la detección de metales alcalinos, alcalino térreos y pesados, entre ellos tenemos: K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Cr⁶⁺ y Cr³⁺, Mn²⁺, Co²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺, Ag⁺, Zn²⁺, Cd²⁺, Hg²⁺, Al³⁺, Pb²⁺, As³⁺, Tl⁺, por mencionar algunos^{1-7,15}. La detección y cuantificación de iones metálicos pesados es un tema de gran importancia en los últimos años porque los iones metálicos están omnipresentes en el ecosistema y en los procesos biológicos de los organismos vivos,

además de tener una descomposición particularmente lenta, lo que conlleva a la bioacumulación de estos elementos causando graves consecuencias en la salud y el medio ambiente. En conclusión, el desarrollo de sensores basados en AgNPs para los diferentes tipos de iones metálicos beneficiaría los procesos industriales, el diagnóstico médico y la inspección ambiental.

3.2.3. Sensores colorimétricos de mercurio basados en AgNPs

Los sensores colorimétricos basados en AgNPs para la detección de Hg^{2+} pueden seguir dos mecanismos de detección: una reacción redox de las AgNPs con el Hg^{2+} , en la cual se registra una variación en la intensidad de la LSPR y/o un desplazamiento en la longitud de onda de extinción de las AgNPs¹⁵ entre 390–410 nm debido a la formación de una nanoaleación (Ag-Hg); o un proceso de agregación de las AgNPs con el Hg^{2+} , el cual funciona como puente entre AgNPs. Este último proceso conlleva una disminución de la LSPR y la formación de una nueva banda entre los 500–650 nm. Ambos mecanismos provocan un cambio de color en la solución y, en consecuencia, disminuye la extinción de la banda LSPR con lo cual se puede establecer una relación entre el valor de extinción de las AgNPs y la concentración de mercurio (II)^{15,34,35}.

Es posible llevar a cabo la detección de Hg^{2+} mediante el mecanismo de reacción redox entre las AgNPs y Hg^{2+} , debido al potencial de electrodo estándar de Ag^+/Ag (0.80 V) que es menor que el de Hg^{2+}/Hg (0.85 V) con lo cual el Hg^{2+} puede reaccionar con las AgNPs para formar mercurio metálico³⁴ y posteriormente se forme la nanoamalgama de plata (nanoaleación). El Hg^{2+} modifica la superficie de las AgNPs, lo que conduce a un cambio del potencial zeta, además de desestabilizar el sistema coloidal³⁰.

La agregación de las AgNPs por parte del Hg^{2+} está controlada por la naturaleza de las moléculas y ligandos presentes en la superficie de las partículas, debido a la afinidad y selectividad de los grupos funcionales en ellos, el reconocimiento molecular específico de ligandos por iones metálicos funciona como un puente que conecta las AgNPs. De la misma manera, la selectividad de los iones metálicos tiene su fundamento de acuerdo con la teoría de ácidos-bases duros y blandos³¹, que indica que los ligandos ricos en átomos de oxígeno tienen una fuerte tendencia hacia los iones de metales alcalinotérreos y ligandos ricos en nitrógeno y azufre para iones de metales pesados y de transición.

Algunos grupos de investigación como el de Rajkumar y col.³⁶ han presentado una sonda colorimétrica selectiva para la detección de Hg^{2+} que emplea AgNPs modificadas con cisteína. En dicho estudio se demostró mediante dispersión Raman mejorada en la superficie (SERS - *surface-enhanced Raman scattering*) que la cisteína está unida a la superficie de las AgNPs a través del tiol con el grupo carboxilato apuntando hacia afuera. Además, observaron que en presencia de Hg^{2+} el pico de absorción disminuye, resultando en un cambio de color debido a la interacción entre las AgNPs y el Hg^{2+} , que causa la desaparición total del pico LSPR. Por otro lado, Chakraborty y col.⁸ han desarrollado un sensor colorimétrico selectivo para Hg^{2+} en agua, basado en la funcionalización de AgNPs con cisteamina. En este estudio mostraron que las moléculas de cisteamina se encuentran unidas a las AgNPs mediante el grupo tiol dejando expuesto el grupo amino. Además, propusieron un mecanismo de detección de Hg^{2+} mediante las AgNPs modificadas con cisteamina, mostrado en la figura 5. En ambas investigaciones se describió que el agente de funcionalización es removido de la superficie de las AgNPs en presencia de Hg^{2+}

permitiendo la reacción redox entre la Ag^0 y el Hg^{2+} que da lugar a la posterior adsorción de Hg elemental en la superficie de las AgNPs produciendo una nanoaleación.

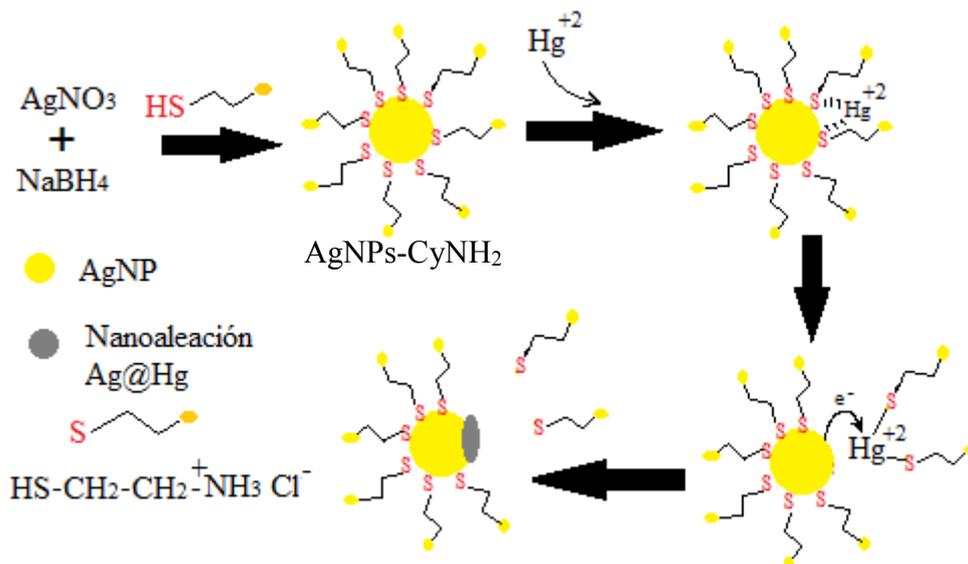


Figura 5: Esquema del mecanismo de sensorio de AgNPs-CyNH₂ ante Hg²⁺. Adaptado de Chakraborty y col.⁸

3.3. Mercurio

3.3.1. Características y propiedades químicas

El mercurio (Hg) es un metal brillante color plata, que pertenece al grupo doce de la tabla periódica y a temperatura ambiente se encuentra en estado líquido. Su temperatura de ebullición es 357,3 °C y su temperatura de fusión es de -38,9 °C, y tiene una densidad de 13,6 g/cm³. El mercurio metálico debido a su alta presión de vapor se evapora fácilmente a temperatura ambiente: a 20°C su concentración en el aire puede alcanzar hasta 0,014 g/m³ y a 100°C hasta 2,4 g/m³. Generalmente se habla de vapor de mercurio cuando el mercurio elemental se encuentra presente en la atmósfera y de mercurio metálico cuando está en su forma líquida⁴¹⁻⁴³. Además del mercurio metálico Hg⁰, el mercurio puede existir en forma de iones Hg¹⁺ y Hg²⁺, también en forma el ion estable Hg₂²⁺, siendo el único de su grupo que presenta esta forma. Por otro lado, en sus complejos el Hg²⁺ presenta números de coordinación del 2 al 6; además el Hg²⁺ es un centro metálico blando y está favorecida la coordinación con dadores azufre.

El Hg presenta baja reactividad a la oxidación, por lo que es atacado por ácidos oxidantes, pero no por los no oxidantes a temperatura ambiente. El mercurio reacciona con los metales para formar aleaciones de mercurio que son conocidas como amalgamas, dentro de los metales más importantes con los cuales el Hg forma amalgamas se encuentran el oro y la plata. Esta propiedad hace atractivo al mercurio en la recuperación de oro en la minería aurífera⁴³.

3.3.2. Mercurio como contaminante del medio ambiente y sus efectos sobre la salud

La contaminación por mercurio es un problema integral que afecta a todo el medio ambiente, además de afectar la salud humana. Una fuente importante de exposición la encontramos en las aguas naturales las cuales son contaminadas por las diferentes actividades económicas en las cuales se utiliza el mercurio, como en la minería de oro, la

fabricación de productos químicos y la quema de combustibles fósiles. Debido a estas actividades las masas de aguas son contaminadas con mercurio debido a una mala administración de los residuos o por un incorrecto almacenamiento. Por citar un ejemplo, en Estados Unidos, las emisiones de Hg son más del 80%, debido a la combustión de combustibles fósiles y la incineración de residuos sólidos, sumado a estas emisiones se encuentra la emisión de fuentes no antropogénicas provenientes de emisiones oceánicas y volcánicas, así como de los incendios forestales². Los vapores de mercurio viajan por la atmosfera hasta ser precipitados en la lluvia y eventualmente son oxidados a Hg^{2+} , ocasionando que el Hg^{2+} se acumule en las plantas, caiga al agua y sea introducido en las diferentes cadenas tróficas de los sistemas acuáticos y terrestres, con lo cual pasa a formar parte de la biota, cuando los animales menores ingieren alimentos o agua contaminada con mercurio, y posteriormente, estos animales pueden ser consumidos por los seres humanos. Tomando en consideración estos procesos, la agencia de protección ambiental de EE. UU. (EPA) ha puesto el límite máximo de 2 ppb (10 nM) para Hg^{2+} en agua potable². Por otro lado, comúnmente en áreas no influenciadas por la industria o la minería el contenido de mercurio se encuentra alrededor de los 0,05 ppb. Por otro lado, en regiones en las cuales la industria emplea mercurio en sus procesos se han reportado valores de entre 0,4 y 0,7 ppb. Según la guía para la calidad del agua potable de la Organización Mundial de la Salud (OMS)⁴⁴, 6 ppb es el límite máximo para mercurio inorgánico en el agua potable. Para el caso de Perú, el Ministerio de Salud en el reglamento de la calidad del agua para consumo humano indica que el límite máximo permisible para mercurio en agua es de 1 ppb⁴⁵.

Por otro lado, una vez que el mercurio se encuentra en el agua, debido a la presencia de bacterias que convierten el mercurio inorgánico en metil mercurio, que es neurotóxico, este puede ingresar a la cadena alimenticia marina e irse acumulando en los peces más grandes que luego serán consumidos por los seres humanos. Debido a la ingesta de especies contaminadas con mercurio se pueden observar diversos trastornos cognitivos y de movimiento, e inclusive cuando los niveles son muy altos puede causar la muerte^{2,5-8}. Un caso de contaminación con mercurio muy conocido ocurrió por el año de 1956 en Japón en la comunidad de Minamata debido a la elevada cantidad de mercurio en el agua y la ingesta de peces contaminados por parte de los pobladores, los cuales desarrollaron daños neurológicos, pérdida de visión y audición, e incluso la muerte (enfermedad de Minamata). Además, se observaron daños a nivel del sistema gastrointestinal, hígado y riñones. Los niños fueron los más afectados desarrollando en corto tiempo trastornos cognitivos y de movimiento (parálisis, temblores, pérdida del control de esfínteres, etc), por otro lado, en niños no natos debido al consumo alimentos contaminados de madres en estado de gestación, se observó que nacían con distrofias severas entre otras dolencias^{2,5,6,9}.

En conclusión, el monitoreo de mercurio en el medio ambiente es muy importante para evitar los efectos perjudiciales en la salud humana, especialmente el monitoreo de los niveles de Hg^{2+} ya que es la forma más común y estable como contaminante, además debido a su gran solubilidad en agua es capaz de contaminar grandes volúmenes de agua. Por esta razón, es sumamente importante la obtención de nuevos métodos de detección de Hg^{2+} que sean rentables, rápidos, fáciles y aplicables a los entornos ambientales en el monitoreo de los niveles de Hg^{2+} .

3.3.3. Técnicas de cuantificación de mercurio en agua

Existen técnicas exactas y precisas para el análisis de mercurio a nivel de trazas (incluso llegan hasta nM y pM), como la cromatografía de gases-plasma acoplado inductivamente-espectrometría de masas (GC-ICP-MS), espectrometría de fluorescencia atómica (AFS), espectroscopía de emisión atómica-plasma acoplado inductivamente (ICP-AES) y cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa (HPLC). A pesar de su excelente sensibilidad, estas técnicas son costosas, requieren mucho tiempo (en las diferentes etapas de preparación de muestra, preparación de estándares y calibración del equipamiento de medición), pues los procedimientos no son lo suficientemente simples (requieren de personal entrenado, además de equipamiento sofisticado y costosos) y no es posible realizar mediciones *in situ*. Por lo tanto, existe un interés creciente en el desarrollo de enfoques alternativos más simples y de menor costo para el análisis *in situ*, extendiendo la aplicabilidad actual y conduciendo a nuevas soluciones de detección miniaturizadas.

Para superar estos problemas, se han desarrollado enfoques alternativos que utilizan sensores colorimétricos y fluorométricos, basados en sondas moleculares y quimiosensores que emplean NPs. Las NPs de metales nobles han demostrado ser particularmente adecuadas para la detección de mercurio debido a su respuesta óptica sensible que surge del LSPR. Su versátil química de superficie ha sido explotada para modificar la superficie de las nanopartículas con una amplia gama de moléculas orgánicas y biológicas, lo que lleva a interacciones específicas con el mercurio⁴⁶.

4. Hipótesis

Los sensores colorimétricos basados en AgNPs recubiertos con ligandos sulfurados cortos como cisteamina y cisteína pueden detectar, y cuantificar de manera selectiva Hg^{2+} en agua mediante espectrofotometría UV-Vis.

5. Parte experimental

5.1. Reactivos, materiales y equipos

5.1.1. Reactivos y materiales

Los reactivos empleados durante la presente tesis se listan en la tabla 1. Por otro lado, cabe especificar que el agua utilizada en todos los experimentos fue ultrapura obtenida del sistema Thermo Scientific NANOpure mediante ósmosis inversa y filtración mediante filtro de fibra hueca de tamaño de poro 0.2 μm .

Tabla 1: Lista de reactivos empleados.

Nombre	Formula	Marca	Grado de pureza
Nitrato de plata	$AgNO_3$	Sigma-Aldrich	$\geq 99\%$

Borohidruro de sodio	NaBH ₄	Sigma-Aldrich	≥99.99%
L-Cisteína hidrociorada monohidratada	C ₃ H ₇ NO ₂ S.HCl.H ₂ O	Merck	≤100%
Cisteamina hidrociorada	C ₂ H ₇ NS.HCl	Sigma-Aldrich	≥98%
Solución de nitrato mercurio (II)	Hg(NO ₃) ₂	Sigma-Aldrich	P.A.
Fosfato de disodio	Na ₂ HPO ₄	Fisher Scientific	P.A.
Fosfato monosódico	NaH ₂ PO ₄	JT Baker	P.A.
Cloruro de magnesio hexahidratado	MgCl ₂ .6H ₂ O	Riedel-de Haën	≥99.9%
Cloruro de calcio dihidratado	CaCl ₂ .2H ₂ O	Merck	≥99.9%
Carbonato de sodio	Na ₂ CO ₃	JT Baker	P.A.
Nitrato de plomo (II)	Pb(NO ₃) ₂	Merck	≥99.98%
Cloruro de estroncio (II) hexahidratado	SrCl ₂ .6H ₂ O	Merck	P.A.
Cloruro de cadmio (II) monohidratado	CdCl ₂ .H ₂ O	Merck	P.A.
Nitrato de zinc (II) tetrahidratado	Zn(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	Merck	P.A.
Nitrato de cobre (II) trihidratado	Cu(NO ₃) ₂ .3H ₂ O	Merck	P.A.
Cloruro de hierro (III) hexahidratado	FeCl ₃ .6H ₂ O	Riedel-de Haën	P.A.
Nitrato de cobalto (II) hexahidratado	Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	Sigma-Aldrich	P.A.
Nitrato de níquel (II) hexahidratado	Ni(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	Sigma-Aldrich	P.A.
Nitrato de cromo (III) nonahidratado	Cr(NO ₃) ₃ .9H ₂ O	Sigma-Aldrich	P.A.
Hidróxido de sodio	NaOH	Macron	P.A.
Ácido clorhídrico	HCl	Merck	37%
Ácido nítrico	HNO ₃	Merck	69%

5.1.2. Equipos

Los equipos utilizados en la caracterización de las AgNPs y los estudios de detección de Hg²⁺ se encuentran en el laboratorio de Análisis Instrumental de la Sección de Química de la Pontificia Universidad Católica del Perú y son los siguientes:

- Espectrofotómetro UV-Visible Perkin Elmer Lambda 850, el cual cuenta con dos fuentes de radiación, una lámpara de deuterio y una lámpara de tungsteno-halógena, que cubren el rango de longitudes de onda 175-900 nm.

- Espectrofotómetro UV-Visible Agilent 8453, que cuenta con dos lámparas como fuentes de luz, la primera de ellas es de deuterio y la segunda es de wolframio que emiten luz entre 190 a 1100 nm. Sistema óptico de haz simple y detector de arreglo de diodos.
- Balanza analítica – AND GH200, presenta una precisión de 1 mg y tiene una carga máxima 220 g.
- Medidor de pH - Medidor pH BASIC 20, tiene un medidor de pH CRISON, puede realizar mediciones por estabilidad o en continuo, presenta una resolución de 0.01.
- Agitador de mezclas Vortex – Heidolph, presenta un movimiento orbital de 5 mm y puede llegar a una velocidad de hasta 2500 rpm.
- Agitador magnético THERMO SCIENTIFIC SP131320-33Q, presenta un rango de temperatura de 5-540 °C y presenta 10 niveles de agitación.
- Centrífuga Sigma 1-16, tiene una capacidad máxima de 24 microtubos y puede llegar a velocidades de 200 – 15000 rpm, con temporizador incorporado.

5.2. Procedimientos

5.2.1. Síntesis de nanopartículas de plata

La síntesis de las AgNPs se llevó a cabo con una modificación del método de Creighton y col.²⁸. El proceso consistió en disolver 1.7 mg de AgNO_3 en 100 mL de agua ultrapura en un frasco de 250 mL. Seguido, se colocó la solución de nitrato de plata en un baño de hielo durante 30 min hasta alcanzar una temperatura de 2 °C, bajo agitación con pastilla magnética constante de 500 rpm. A continuación, se adicionó la solución de borohidruro de sodio (1.5 mg en 700 μL), preparada al instante disolviendo el NaBH_4 con agua fría, en alícuotas de 20 μL . Cuando se adicionó por completo la solución de NaBH_4 , se retiró el recipiente del baño de hielo y se dejó bajo agitación constante hasta que la solución llegara a temperatura ambiente. Una representación esquemática del proceso se muestra en la figura 6.

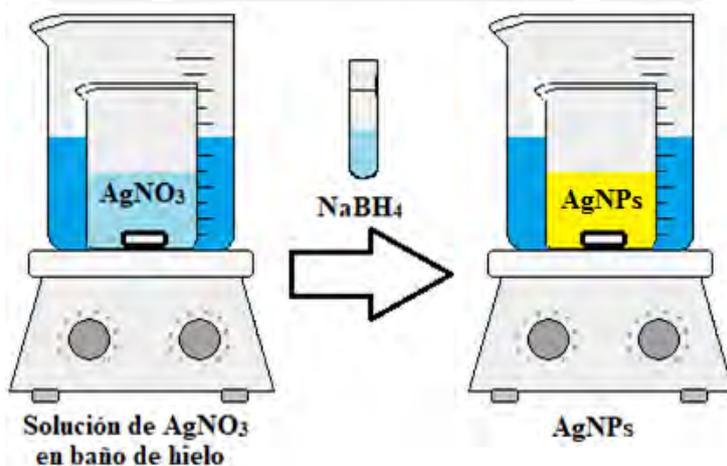


Figura 6: Esquema del proceso de síntesis de las AgNPs.

5.2.2. Protocolo de funcionalización de las AgNPs con cisteamina

Una vez sintetizadas las AgNPs se ajustó el pH en 4 con una solución de HCl 0.1 M. Luego se adicionó gota a gota bajo agitación constante la solución de CyNH_2 (0.3 mg de

CyNH₂ en 1 mL de agua ultrapura, 3.9 mM) y se dejó bajo agitación durante 1 hora. Después se eliminó el exceso de ligando que pudiera estar en la solución mediante centrifugación (9000 rpm por 30 min), se eliminó el líquido sobrenadante y se resuspendió el coloide con agua ultrapura ajustada a pH 4. Esta solución se almacenó a temperatura ambiente en un recipiente protegido de la luz, para cuando fuera empleada en la caracterización y ensayos posteriores. Para la funcionalización se ha empleado la notación x5, x10, x20 que hace referencia al volumen de ligando a emplear según a la notación x1 definido para 62.5 μL de ligando por cada 25 mL de AgNPs.

5.2.3. Protocolo de funcionalización de las AgNPs con cisteína

Habiendo realizado previamente la síntesis de las AgNPs, seguido se adicionó la solución de Cy (0.399 mg de CyNH₂ en 1 mL de agua ultrapura, 3.3 mM) gota a gota y se dejó bajo agitación durante 1 hora. Luego se eliminó el exceso de ligando de la solución mediante centrifugación (9000 rpm por 30 min), eliminando el líquido sobrenadante y resuspendiendo el coloide con agua ultrapura ajustada a pH 8. Esta solución se almacenó a temperatura ambiente en un recipiente protegido de la luz, para cuando fuera empleada en la caracterización y ensayos posteriores. Para la funcionalización se ha empleado la notación x5, x10, x20 que hace referencia al volumen de ligando a emplear según a la notación x1 definido para 62.5 μL de ligando por cada 25 mL de AgNPs.

5.2.4. Caracterización de las AgNPs mediante espectroscopía UV-Vis

La caracterización de las AgNPs recién sintetizadas o funcionalizadas con CyNH₂ o Cy se realizó mediante espectroscopia UV, mediante la longitud de onda a la que aparecía la LSPR característica para AgNPs esféricas. Experimentalmente se tomó 1 mL de las NPs y se miden en el espectrofotómetro realizando un barrido entre 300-700 nm.

5.2.5. Caracterización de las AgNPs mediante microscopía TEM

Para las mediciones TEM, se colocó una alícuota de pocos microlitros del coloide en una rejilla de cobre recubierta de carbono y se secó a temperatura ambiente. Las imágenes de TEM se tomaron utilizando un microscopio DeLong America LVEM5 y fueron analizadas utilizando el software ImageJ. Los tamaños de las AgNPs se informan como la media del diámetro ± desviación estándar de las mediciones.

5.2.6. Detección de Hg²⁺ con las AgNPs-CyNH₂

Para la evaluación de la detección de Hg²⁺ por el sensor de AgNPs-CyNH₂, se preparó una solución stock de Hg²⁺ de 500 μM en medio ácido (solución de HNO₃ al 0.25%) a partir de la cual se realizaron diluciones adecuadas para cada patrón cuyo rango de concentración va desde 0 – 20 μM.

a) Protocolo inicial

Se colocó en un microtubo de 2 mL, 700 μL de las AgNPs-CyNH₂, 770 μL de agua ultrapura y 30 μL de solución de Hg²⁺ en ácido nítrico (solución de HNO₃ al 0.25%). Se agitó la mezcla durante 20 segundos y después de 5 min se midió la muestra en el espectrofotómetro realizando un barrido entre 300 y 700 nm.

b) Protocolo optimizado

Para las pruebas se emplearon microtubos de 2 mL en los cuales se adicionó en el siguiente orden los componentes del ensayo: 600 μL de las AgNPs-CyNH₂x10, 870 μL de agua ultrapura y 30 μL de la solución de Hg²⁺ en HNO₃ al 0.25%, se agitó la mezcla durante 20 segundos y se dejó reaccionar durante 2 minutos, luego se midió la muestra en el espectrofotómetro realizando un barrido entre 300 y 700 nm.

Se definió como “1X” a la concentración de AgNPs-CyNH₂ correspondiente una absorbancia de 0.5 a 395 nm.

5.2.7. Detección de Hg²⁺ con las AgNPs-Cy

Para la evaluación de la detección de Hg²⁺ por el sensor de AgNPs-Cy, se preparó una solución stock de Hg²⁺ de 500 μM en HNO₃ al 0.25% a partir de la cual se realizaron diluciones adecuadas para cada patrón cuyo rango de concentración va desde 0 – 5 μM .

a) Protocolo inicial

Se colocó en un microtubo de 2 mL: 700 μL de las NPs, 770 μL de agua ultrapura y 30 μL de solución de Hg²⁺ en ácido nítrico al 0.25%. Se agitó la mezcla durante 20 segundos y posteriormente se midió la muestra en el espectrofotómetro realizando un barrido entre 300 y 700 nm.

b) Protocolo optimizado

Para las pruebas se emplearon microtubos de 2 mL en los cuales se adicionó en el orden siguiente los componentes del ensayo: 600 μL de las AgNPs-Cyx10, 785 μL de agua ultrapura, 100 μL de buffer fosfato pH 8 (0.1 M) y 15 μL de la solución de Hg²⁺ en HNO₃ al 0.25%, se agitó la mezcla durante 20 segundos y se deja reaccionar durante 20 minutos, luego se midió las muestras en el espectrofotómetro realizando un barrido entre 300 y 700 nm.

Se definió como “1X” a la concentración de AgNPs-Cy correspondiente una absorbancia de 0.5 a 395 nm.

5.2.8. Estudio de interferentes

Para el ensayo se prepararon soluciones 1 mM de las siguientes sales: MgCl₂.6H₂O, CaCl₂.2H₂O, Na₂CO₃, Pb(NO₃)₂, SrCl₂.6H₂O, CdCl₂.H₂O, Zn(NO₃)₂.4H₂O, Cu(NO₃)₂.3H₂O, FeCl₃.6H₂O, Co(NO₃)₂.6H₂O, Ni(NO₃)₂.6H₂O, Cr(NO₃)₃.9H₂O, a partir de las cuales se tomarían alícuotas para cada ensayo. El estudio de los interferentes se realizó mediante el método de presencia y ausencia de Hg²⁺. El procedimiento de este ensayo es el mismo que los protocolos para cada sensor, con la salvedad que se reduce cantidad de agua ultrapura y es reemplazada por la solución de la sal, la cual se agrega al final en cada proceso. Es decir, mantienen el siguiente orden: AgNPs-funcionalizadas, agua ultrapura, buffer pH 8 (para AgNPs-Cy), solución de Hg²⁺ (o solución de HNO₃ al 0.25%, para el blanco) y solución de la sal a evaluar.

5.2.9. Detección de Hg^{2+} en muestras de agua reales

Se evaluaron dos muestras de agua reales a las cuales se denominó agua de manantial 1 (San Mateo) y agua de manantial 2 (Iceland), las cuales fueron caracterizadas por las mediciones de la conductividad y pH.

Para este estudio se empleó el protocolo descrito con anterioridad para cada sensor con la salvedad que se redujo el contenido de agua ultrapura y se reemplazó por el agua de manantial.

6. Resultados

6.1. Síntesis y caracterización de AgNPs empleando espectroscopia UV-Vis

Las AgNPs se sintetizaron empleando el protocolo descrito en el apartado 5.2.1. observándose que al adicionar el $NaBH_4$ la solución adquirió una coloración amarillo intensa característica para las AgNPs esféricas (ver figura 7a). Las AgNPs luego de ser funcionalizadas y lavadas se muestran en la figura 7b.

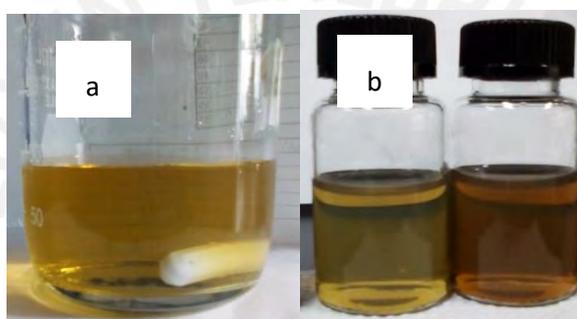


Figura 7: Fotografías de a) AgNPs antes de ser funcionalizadas b) AgNPs-CyNH₂ (izquierda) y AgNPs-Cy (derecha).

6.1.1. Caracterización de AgNPs mediante espectrometría UV-Vis

a) Caracterización de AgNPs

La caracterización se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito en el acápite 5.2.4, obteniendo el espectro UV-Vis que se muestra en la figura 8.

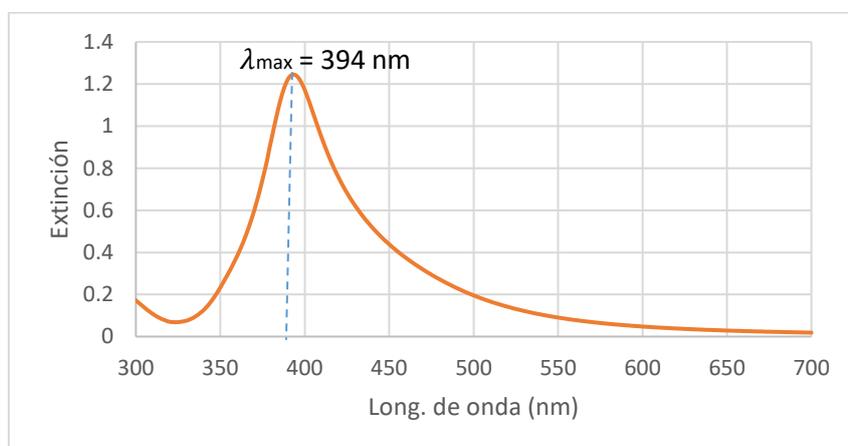


Figura 8: Espectro UV-Vis de AgNPs.

En la fig. 8 se observa la banda de resonancia plasmónica, la cual tiene su máximo a 394 nm. Para el método empleado, basado en la reducción de AgNO_3 con NaBH_4 , se han reportado previamente AgNPs esféricas con diámetro promedio de 51 nm y banda de resonancia plasmónica que aparece alrededor de los 400 nm²⁸.

b) Caracterización de AgNPs funcionalizadas con cisteamina (AgNPs-CyNH_2)

Para las AgNPs funcionalizadas según el protocolo descrito en el acápite 5.2.2, se obtuvo el espectro UV-Vis mostrado en la figura 9, en la que se tiene el máximo de la banda de resonancia plasmónica a 395 nm.

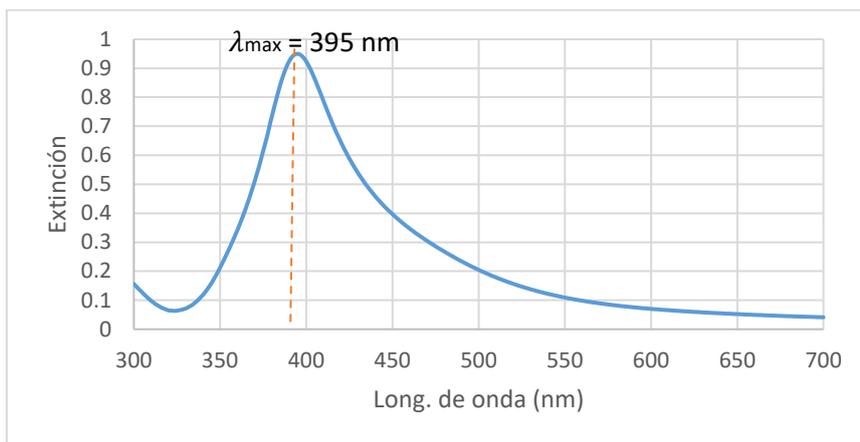


Figura 9: Espectro UV-Vis de AgNPs-CyNH₂.

c) Caracterización de AgNPs funcionalizadas con cisteína (AgNPs-Cy)

Para las AgNPs funcionalizadas según el protocolo descrito en el acápite 5.2.3, se obtuvo el espectro UV-Vis mostrado en la figura 10, en la que se tiene el máximo de la banda de resonancia plasmónica a 392 nm.

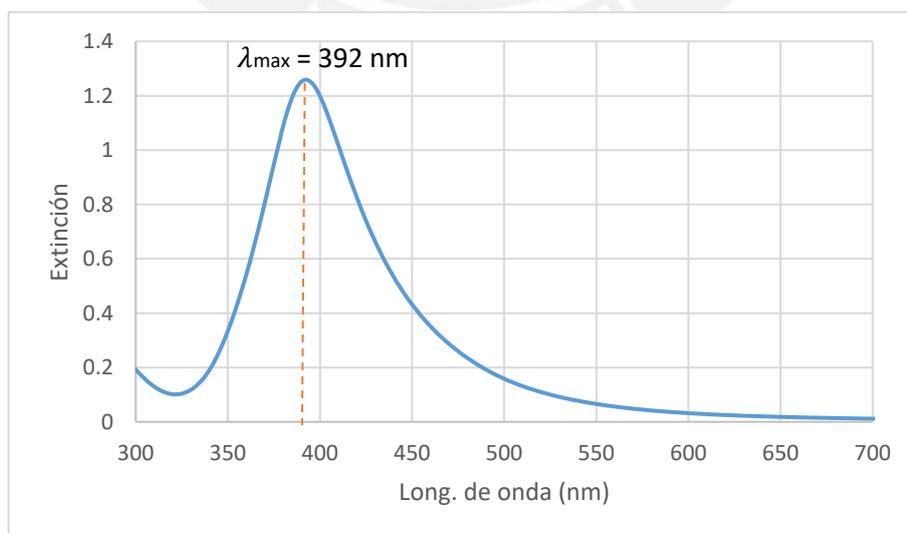


Figura 10: Espectro UV-Vis de AgNPs-Cy.

6.1.2. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

La caracterización mediante TEM se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito en el acápite 5.2.5, obteniendo las imágenes que se muestran en la figura 11 y el gráfico de la distribución de tamaños de diámetros que se muestra en la figura 12. El diámetro promedio resultó ser de 31 ± 8 nm.

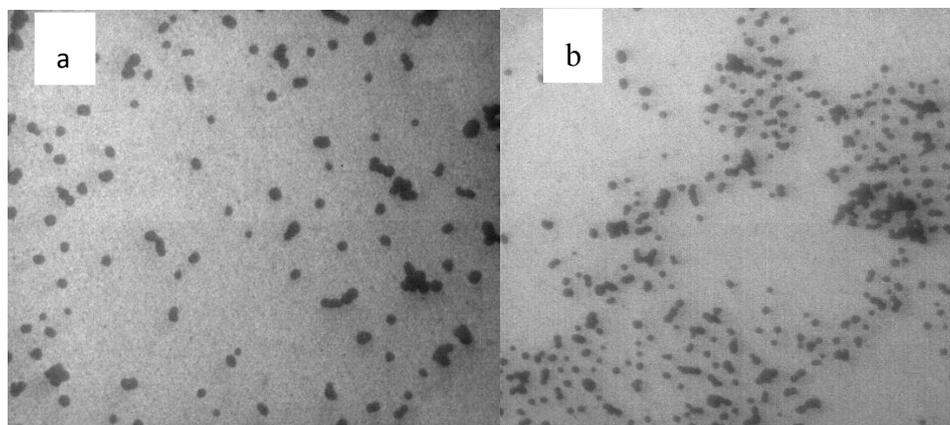


Figura 11: Imágenes TEM de las AgNPs-CyNH₂ a) escala de 100 nm y b) escala de 200 nm.

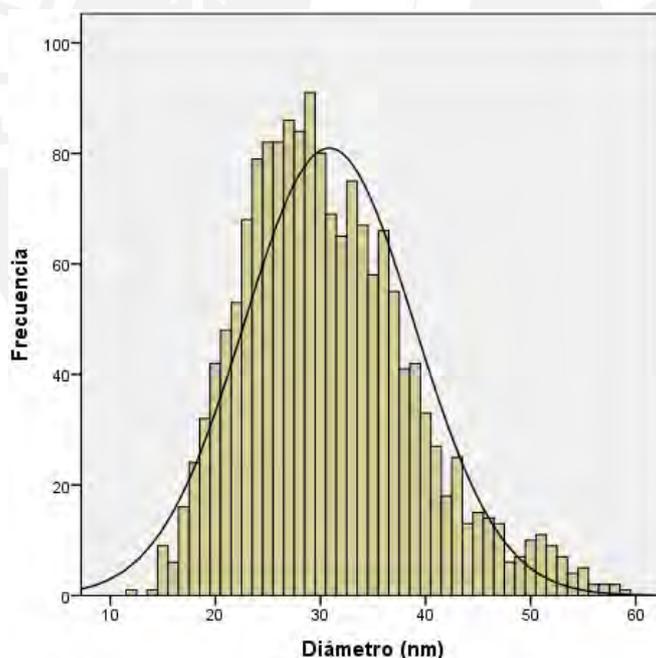


Figura 12: Histograma de la distribución del diámetros de las AgNPs-CyNH₂ obtenidas mediante las imágenes TEM.

6.2. Detección de Hg²⁺ con AgNPs funcionalizadas con cisteamina

6.2.1. Ensayos preliminares

Antes de realizar la optimización del sensor colorimétrico basado en AgNPs-CyNH₂, se realizaron unos ensayos preliminares para testar la respuesta y selectividad del sensor ante Hg²⁺, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 5.2.6.

Primero, se evaluó la detección de Hg^{2+} por parte de las AgNPs-CyNH₂ sin lavar (AgNPs-CyNH₂_SL). Los espectros resultantes se muestran en la figura 13, en la cual se observa que no existe una respuesta significativa ante la presencia de Hg^{2+} por parte de las AgNPs-CyNH₂_SL. Este resultado indicaría que las AgNPs-CyNH₂_SL no estarían interactuando con el Hg^{2+} , pues el exceso de ligando en solución no permitiría que interactúen las AgNPs y el mercurio.

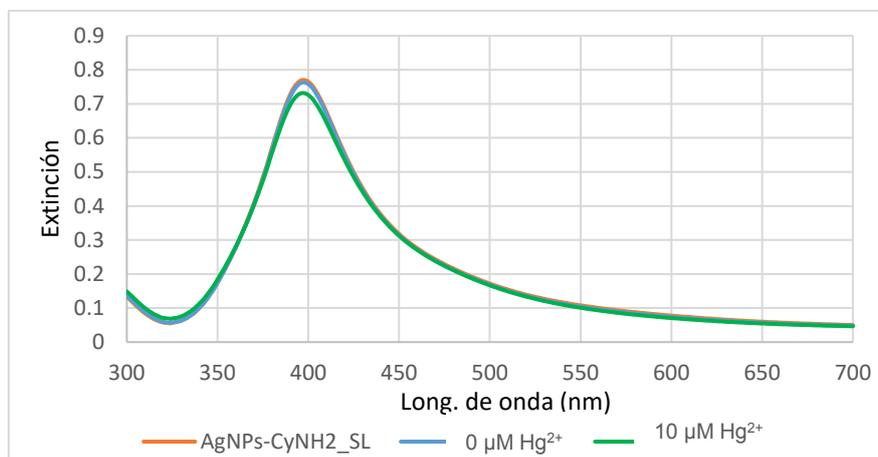


Figura 13: Espectro UV-Vis de AgNPs-CyNH₂_SL, AgNPs-CyNH₂_SL + 0 μM Hg^{2+} , AgNPs-CyNH₂_SL + 10 μM Hg^{2+} .

Luego, se evaluó la detección de Hg^{2+} por parte de las AgNPs-CyNH₂ lavadas (AgNPs-CyNH₂_L), los espectros resultantes se muestran en la figura 14, en la cual se observa que existe una disminución significativa de la banda plasmónica y un desplazamiento de la misma hacia menores longitudes de onda (desplazamiento batocrómico). Este resultado indicaría que el sensor basado en AgNPs-CyNH₂ presenta una respuesta específica que puede determinar la cantidad de Hg^{2+} .

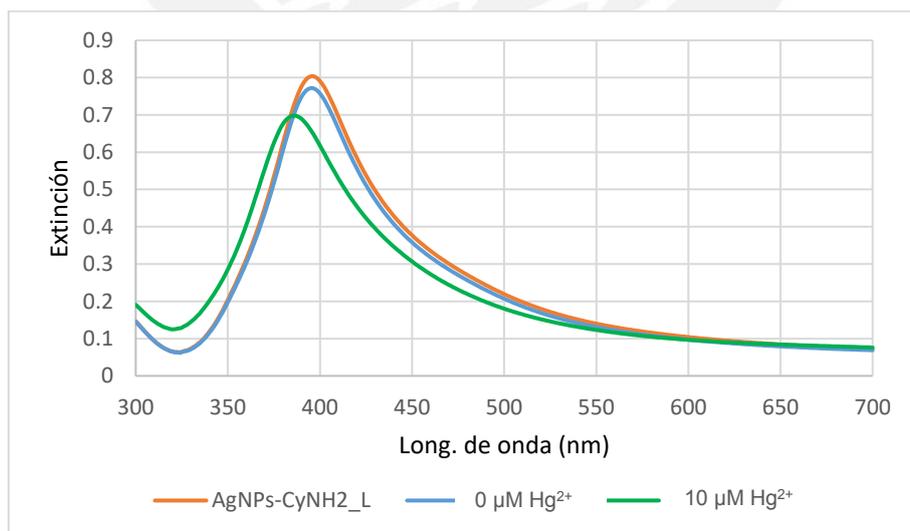


Figura 14: Espectro UV-Vis de AgNPs-CyNH₂_L, AgNPs-CyNH₂_L + 0 μM Hg^{2+} , AgNPs-CyNH₂_L + 10 μM Hg^{2+} .

Para estudiar la estabilidad y selectividad otorgadas por CyNH₂ a las AgNPs, se llevaron a cabo ensayos en presencia de diferentes concentraciones de Ca(II), el catión más importante y responsable de la llamada dureza del agua (junto con el Mg²⁺). Se obtuvieron los espectros mostrados en las figuras 15 y 16 para AgNPs (sin funcionalizar) y AgNPs-CyNH₂, respectivamente.

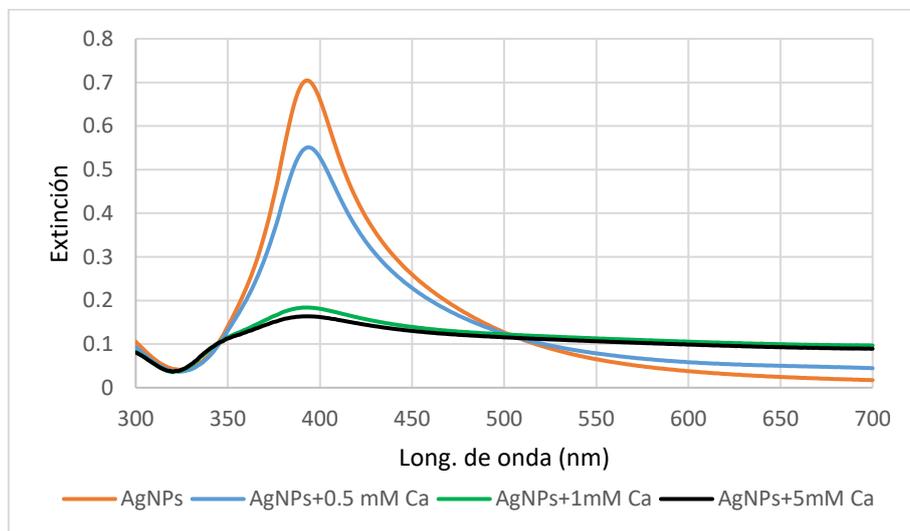


Figura 15: Espectros UV-Vis de AgNPs expuestas a diferentes concentraciones de Ca.

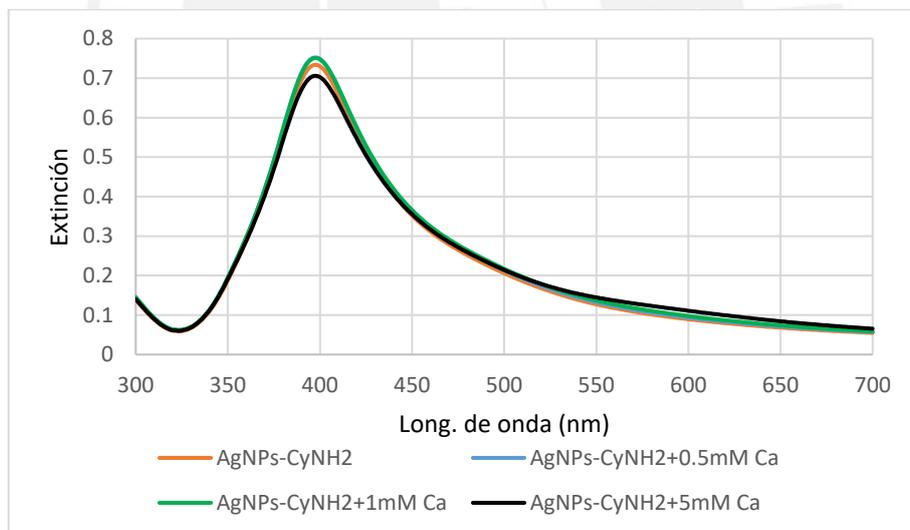


Figura 16: Espectros UV-Vis de AgNPs-CyNH₂ expuestas a diferentes concentraciones de Ca.

En las figuras 15 y 16 se observa que para las AgNPs sin funcionalizar a partir de 0.5 mM de Ca²⁺ hay una disminución de la intensidad de la banda plasmónica, que cae completamente para 1 mM de Ca²⁺. En contraste, las AgNPs-CyNH₂ soportan hasta una concentración de 5 mM de Ca²⁺ sin observarse variaciones significativas en la banda plasmónica, tanto en intensidad como en desplazamiento en su longitud de onda.

Finalmente, se estudió el comportamiento de las AgNPs (sin funcionalizar) y AgNPs-CyNH₂ a diferentes pHs (4, 6 y 8). Para realizar los ensayos a pH 4 se ajustó el pH con

HCl 0.1 M, mientras que para los pHs 6 y 8 se ajustó el pH con buffer fosfato 0.1 M. Se obtuvieron los siguientes espectros UV-Vis mostrados en las figuras 17 y 18.

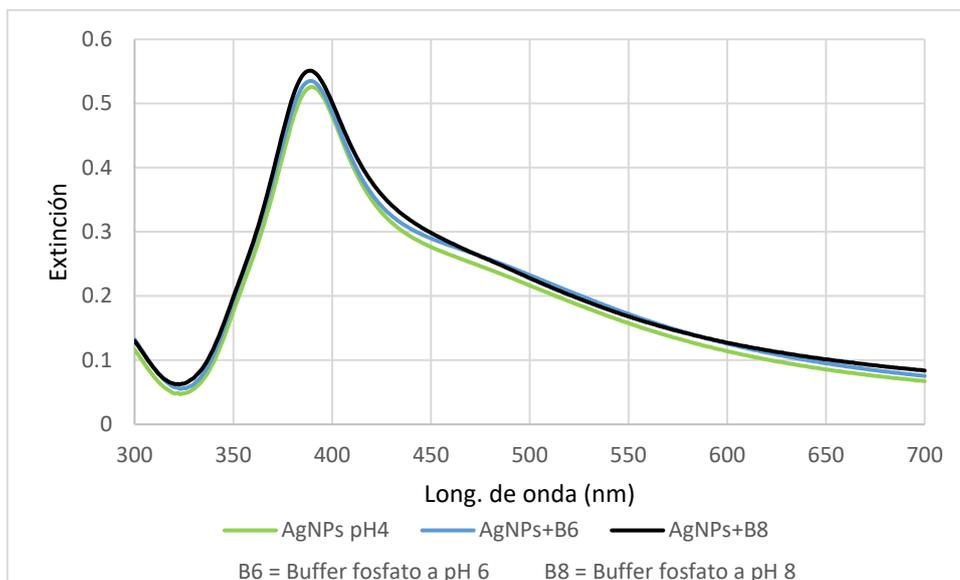


Figura 17: Espectro UV-Vis de las AgNPs a pH 4, 6 y 8.

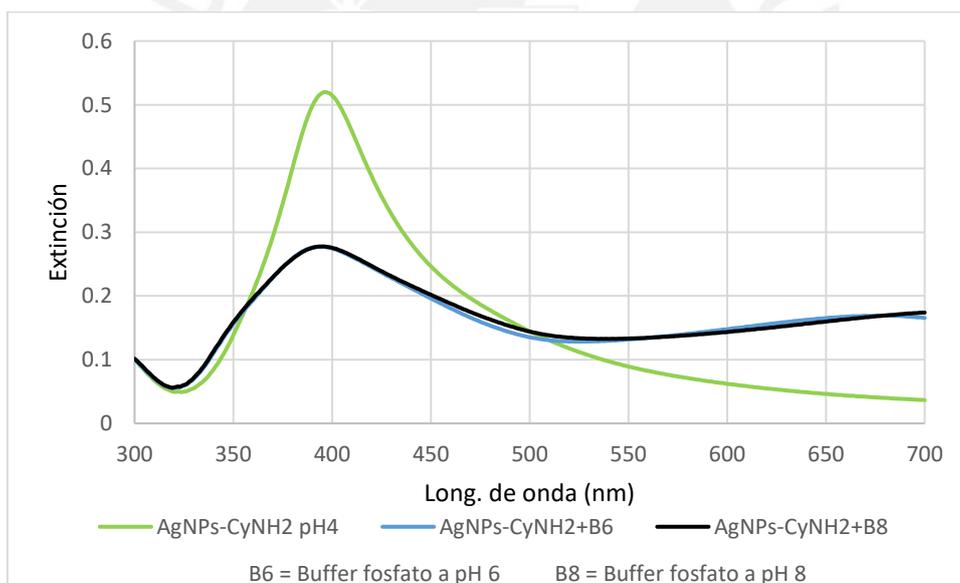


Figura 18: Espectro UV-Vis de las AgNPs-CyNH₂ a pH 4, 6 y 8.

De las figuras 17 y 18 se observa que las AgNPs no presentan variación alguna en la banda plasmónica ante el cambio de pH que ocasiona un cambio en la fuerza iónica, pues estas se encuentran rodeadas por la doble capa eléctrica que forma el agua alrededor de las AgNPs. Por otro lado, para las AgNPs-CyNH₂, solo permanece la banda plasmónica cuando se encuentran a pH 4, tal como lo describió Mukherjee y col.²⁸ pues en medios ácidos las AgNP-CyNH₂ se encuentran dispersas mientras a que en medios básicos se agregan debido a la formación de puentes hidrógeno.

6.2.2. Optimización del ensayo de detección de Hg^{2+}

6.2.2.1. Evaluación de la cantidad de ligando

Este ensayo se llevó a cabo según como se ha descrito en el apartado 5.2.2. Dentro del proceso de optimización del sensor AgNPs-CyNH₂ para la detección de Hg^{2+} , se evaluó el efecto de la cantidad de ligando sobre la banda plasmónica. Se obtuvieron los espectros mostrados en la figura 19.

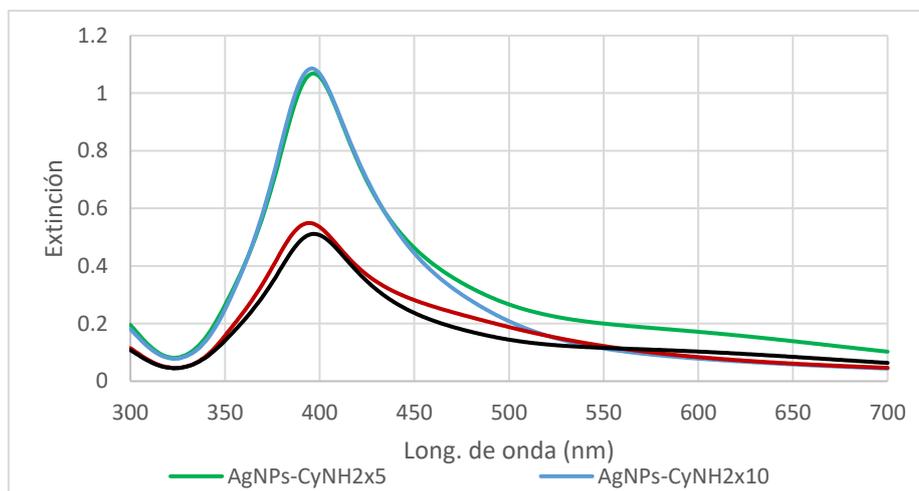


Figura 19: Espectros UV-Vis de AgNPs-CyNH₂ con diferentes cantidades de ligando.

En la figura 19, se observa que las AgNPsCyNH₂x10 presentan una buena intensidad de la banda plasmónica al igual que AgNPsCyNH₂x5, con la diferencia que AgNPsCyNH₂x10 es más estable en el tiempo. Además, se observa un pequeño incremento de la banda para las AgNPs-CyNH₂x5 en el rango de 500-650 nm, lo que podría indicar que se están agregando las AgNPs. Para mayores cantidades de ligando (x20, x50), la banda disminuye su intensidad y se ancha, debido al exceso de ligando que puede dar lugar a la aglomeración de las AgNPs, es decir, que las AgNPs de plata empiezan a asociarse formando partículas más grandes, ocasionando una distribución amplia de AgNPs que ocasiona que se anche la banda. Entonces, se escogió AgNPsCyNH₂x10 para las demás mediciones.

6.2.2.2. Efecto de la cantidad de AgNPs-CyNH₂ en la detección de Hg^{2+}

Se evaluó el efecto de la cantidad de AgNPs-CyNH₂x10 (1X, 1.5X y 2X), siguiendo el protocolo descrito en el apartado 5.2.6. Se obtuvieron los resultados que se muestran en la figura 20.

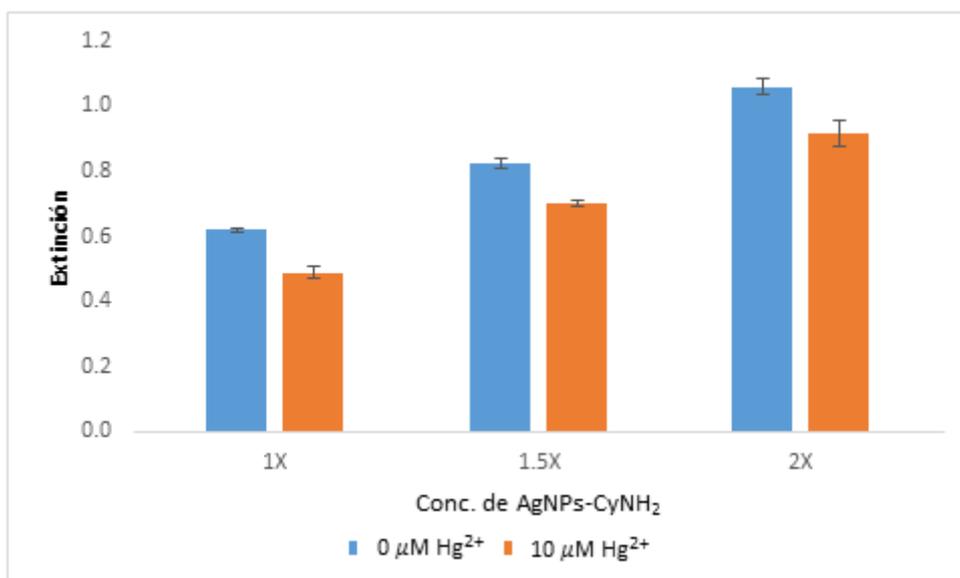


Figura 20: Gráfica del efecto de la cantidad de AgNPs-CyNH₂x10 para la detección de Hg²⁺.

De la figura 20 se puede observar una respuesta similar (disminución de señal) para las tres cantidades de AgNPs-CyNH₂x10 en el ensayo. Se eligió 1.5X para los ensayos posteriores, debido a que presenta una intensidad de la banda plasmónica adecuada que permite observar los cambios al variar la concentración de Hg²⁺, además de presentar un error pequeño. No se eligió 1X debido a la mayor saturación del sensor.

6.2.2.3. Evaluación del tiempo de incubación para la detección de Hg²⁺

Para la evaluación del tiempo de incubación, se tomaron primeramente tiempos relativamente largos (5, 10, 20 y 30 min) para 0, 5 y 20 μM de concentración final de Hg²⁺. Los resultados se muestran en la figura 21.

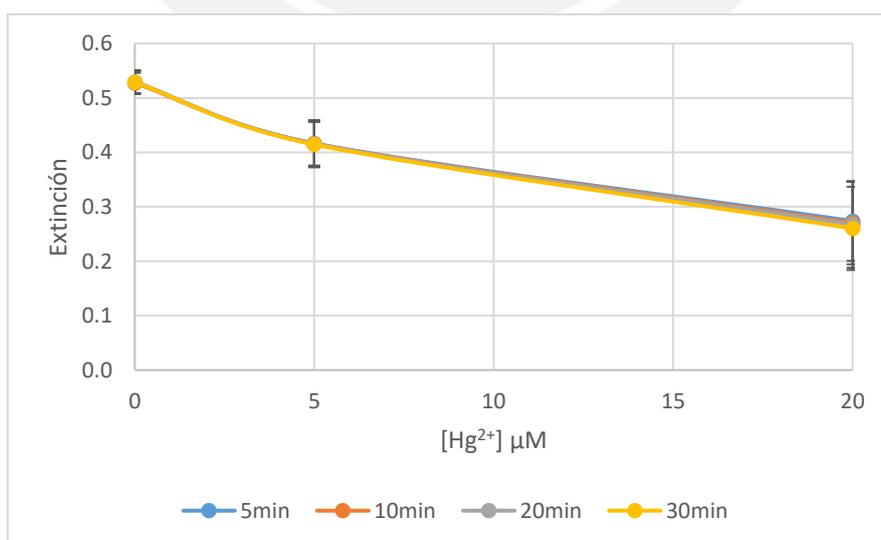


Figura 21: Gráficos de concentración de Hg²⁺ versus extinción, para los tiempos 5, 10, 20 y 30 min.

En la figura 21 se observa que para todos los tiempos de incubación la respuesta es la misma frente a las diferentes concentraciones de Hg^{2+} , pero al aumentar la concentración de Hg^{2+} el error se incrementa.

Por ello, se probaron tiempos de incubación más cortos: 1, 3 y 5 min. Los resultados se muestran en la figura 22.

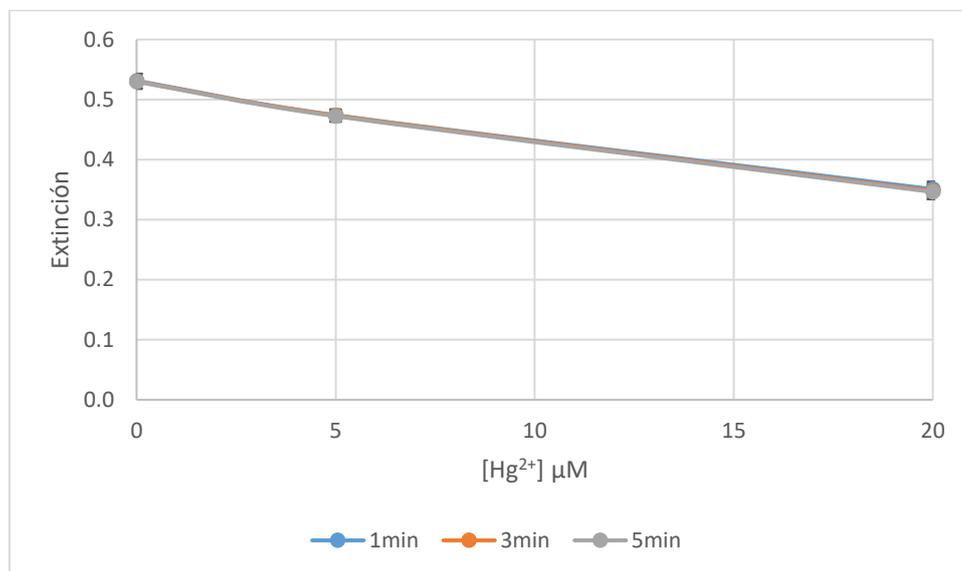


Figura 22: Gráfica de concentración de Hg^{2+} versus extinción, para los tiempos 1, 3 y 5 min.

En la figura 22 se observa que, para todos los tiempos de incubación, la respuesta es muy similar frente a las diferentes concentraciones de Hg^{2+} , además de que al aumentar la concentración de Hg^{2+} , el error se mantiene pequeño. Por lo que por comodidad para la preparación de cada ensayo de medición se definió 2 minutos como tiempo de incubación óptimo.

6.2.3. Curva de calibración de Hg^{2+} para el sensor de AgNPs-CyNH₂ mediante espectrofotometría UV-Vis

Para la realización de la curva de la calibración, se emplearon los parámetros previamente establecidos como son: cantidad de ligando a emplear en las AgNPs-CyNH₂x10, cantidad de NPs de 1.5X y tiempo de incubación de 2 minutos. Las mediciones se realizaron por triplicado. Los resultados se muestran en la figura 23.

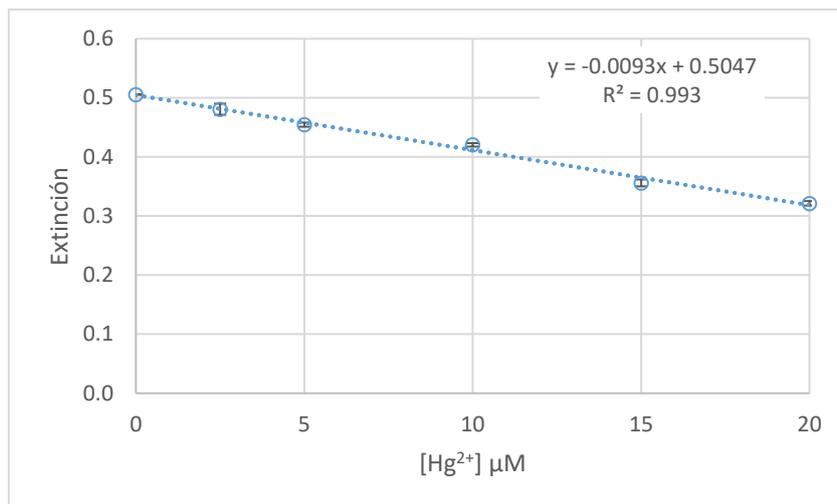


Figura 23: Curva de calibración de Hg²⁺ para el sensor de AgNPs-CyNH₂x10.

De los resultados mostrados en la figura 23, se puede observar que la curva presenta una tendencia lineal. Aplicando regresión lineal a los datos, se determinó la ecuación de la recta y el límite de detección del sensor AgNPs-CyNH₂x10 para Hg²⁺. Tomando en consideración tres veces la desviación estándar de la concentración 0 μM de Hg²⁺, se obtiene un valor de límite de detección de 108 nM.

6.2.4. Evaluación de la detección de Hg²⁺ en presencia de iones interferentes

Se realizó la evaluación de los iones interferentes siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 5.2.8. Para evaluar la respuesta del sensor de AgNPs-CyNH₂ frente a Hg²⁺ en presencia de algunos iones que se encuentran comúnmente en el agua como Ca²⁺, Na⁺, Mg²⁺, CO₃²⁻, Cl⁻ y NO₃⁻, además de otros metales pesados como Pb²⁺, Fe³⁺, Cd²⁺, Cr³⁺, Zn²⁺, Sr²⁺, Ni²⁺, Co²⁺ y Cu²⁺, se realizó este ensayo empleando el método de ausencia y presencia de Hg²⁺ para una concentración final de 20 μM. Se empleó una concentración de las sales interferentes de 133 μM para cada una de ellas, tomando en consideración la concentración a los iones que dan la dureza al agua que son el calcio y el magnesio, para el caso del magnesio se evaluaron concentraciones menores, pero se observaron los mismos resultados. Los resultados se muestran en la figura 24. Se observa que el sensor de AgNPs-CyNH₂ es bastante selectivo a la mayoría de iones evaluados, excepto por el ion magnesio, el cual presenta respuesta similar al mercurio. Una explicación detallada de esta observación se brinda en el apartado 7.4.

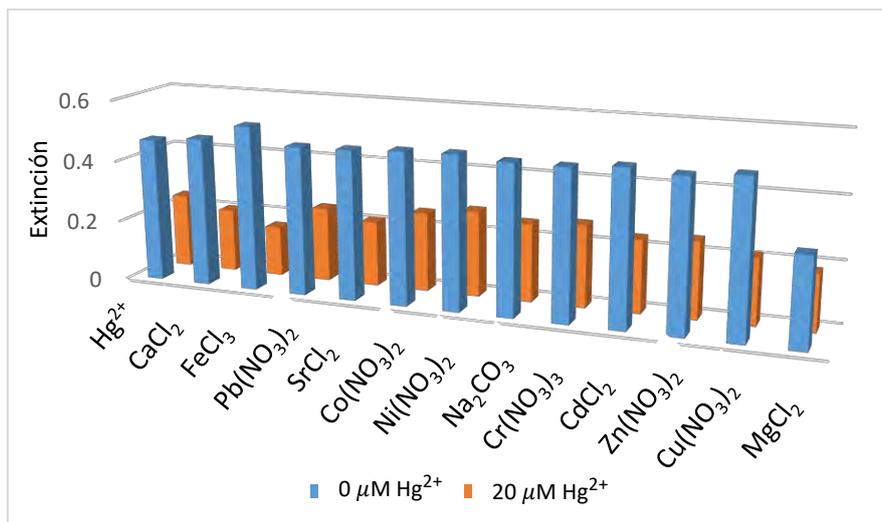


Figura 24: Diagrama de barras de diferentes sales utilizadas como interferentes en la detección de Hg²⁺.

6.2.5. Ensayo de detección de Hg²⁺ en muestras de agua reales

Se realizó el ensayo siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 5.2.9 para evaluar el uso del sensor basado en AgNPs-CyNH₂ para detectar Hg²⁺ en muestras de agua reales, para tal fin se caracterizaron las muestras agua, ver tabla 2.

Tabla 2: Datos de caracterización de las aguas de manantial.

Muestra	Conductividad (μS/cm)	pH
Agua de manantial 1	736±1	7.75±0.01
Agua de manantial 2	105.9±0.1	7.18±0.01

Los resultados del ensayo para detectar Hg²⁺ con el sensor basado en AgNPs-CyNH₂ en muestras de agua reales se muestran en la figura 25. Se emplearon 60 μL de agua de manantial 1 y 750 μL de agua de manantial 2.

En la figura 25 se observa que la respuesta del sensor de AgNPs-CyNH₂ en agua ultrapura es muy similar tanto para el agua de manantial 1 como para el agua de manantial 2, lo que es un buen indicio, pues el sensor responde de manera adecuada en medios diferentes al ensayo en agua ultrapura. Cabe resaltar que se emplearon diferentes cantidades de las aguas de manantial en los ensayos debido al diferente contenido de sales disueltas en cada muestra. Por otro lado, se observa que los errores son pequeños tanto para el cero como para las muestras con Hg²⁺.

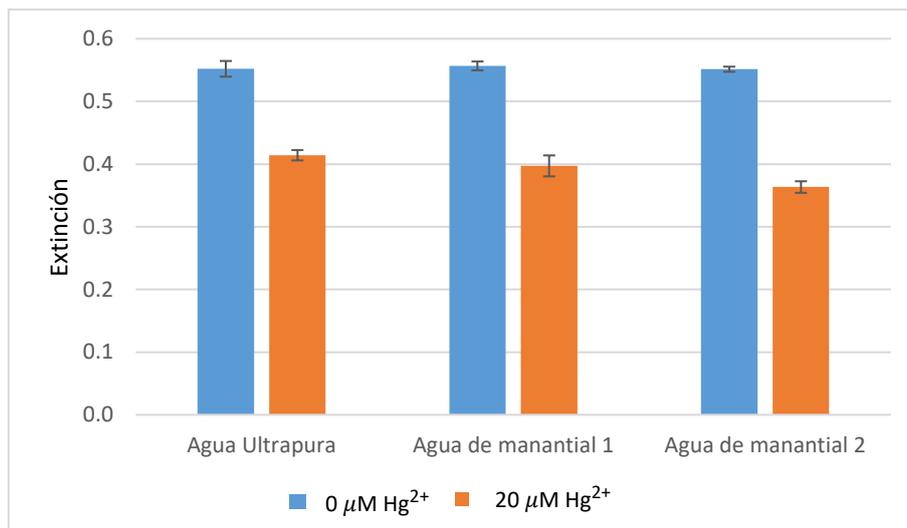


Figura 25: Comparación de la respuesta a la detección de Hg^{2+} por parte del sensor AgNPs-CyNH_2 en muestras de agua reales.

6.3. Evaluación de detección de Hg^{2+} con AgNPs funcionalizadas con cisteína

6.3.1. Ensayos preliminares

Después de la síntesis de las AgNPs siguiendo el protocolo descrito en el acápite 5.2.1, se procedió a funcionalizar las AgNPs con cisteína según el protocolo descrito en 5.2.3. Inicialmente, se evaluó la estabilidad del coloide a pHs de 6, 7 y 8 empleando buffer fosfato 0.1 M. Los resultados se muestran en la figura 26.

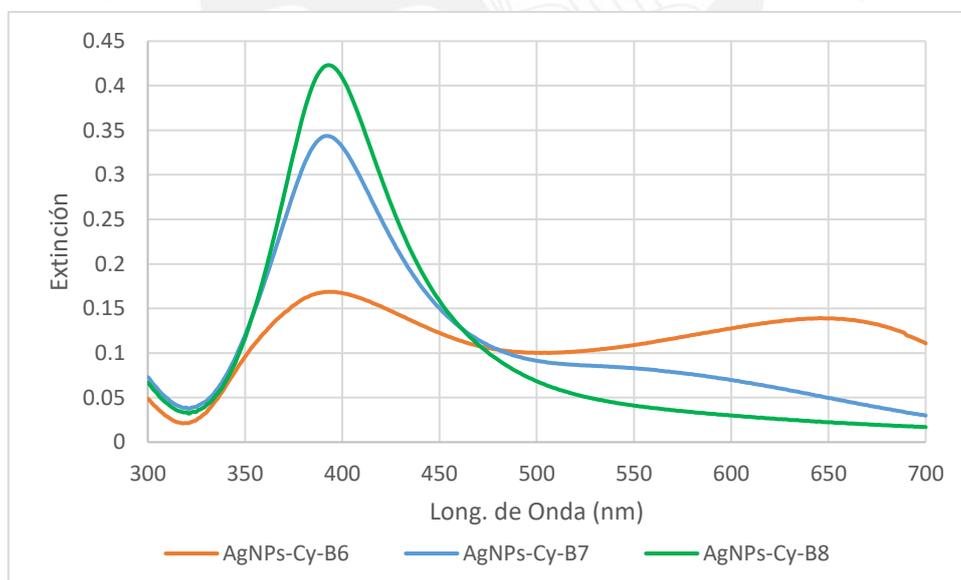


Figura 26: Espectros de AgNPs-Cy a pH 6, 7 y 8.

En la figura 26 se observa que existe agregación de las AgNPs-Cy a pH 6 y 7, que no se observa al emplear el buffer a pH 8. Por ello, para los ensayos posteriores se empleó buffer a pH 8. Pues pHs básicos, los grupos carboxilos están cargados negativamente ($\text{pK}_a=1.96$) y los grupos amino ($\text{pK}_a=8.18$) no se encuentran cargados, por lo que no existe

interacciones electrostáticas o formación de puentes de puentes de hidrógeno entre los grupos amino y carboxilatos que induzcan agregación.

Para evaluar la detección de Hg^{2+} por parte de las AgNPs funcionalizadas con cisteína, se siguió el protocolo descrito en el apartado 5.2.7. Se evaluaron las AgNPs sin funcionalizar ante una solución $2 \mu\text{M}$ de Hg^{2+} de concentración final. Los espectros resultantes se muestran en la figura 27, en la cual se observa que no existe respuesta clara de la banda plasmónica.

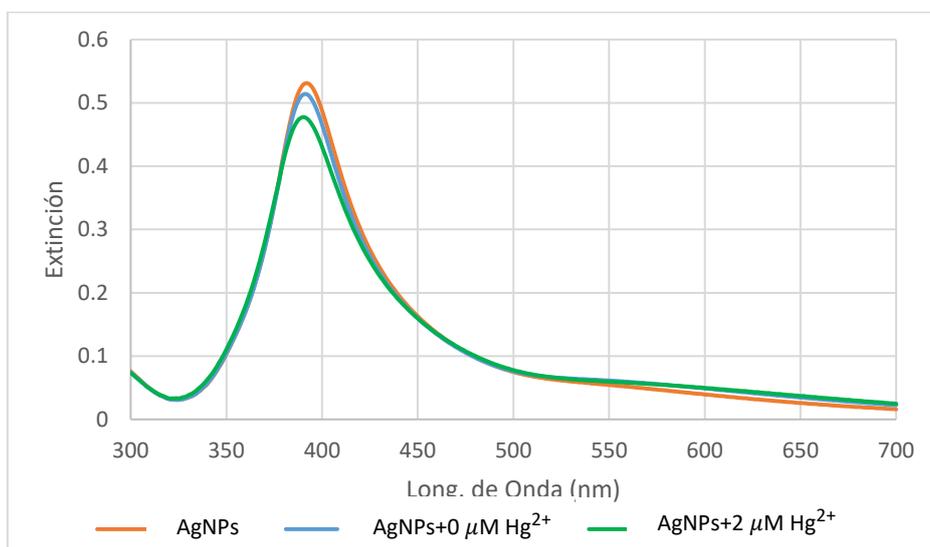


Figura 27: Espectro UV-Vis de AgNPs interactuando con Hg^{2+} en presencia de buffer pH 8.

Por otro lado, también se evaluaron las AgNPs-Cy sin lavar (AgNPs-Cy_SL) en presencia de Hg^{2+} . Los espectros resultantes se muestran en la figura 28, en la cual se observa que no existe una respuesta significativa ante Hg^{2+} . Esto indicaría que AgNPs-Cy_SL no estarían interactuando eficientemente con el Hg^{2+} debido al exceso de ligando en solución, pues el ligando en exceso no permitiría la interacción entre las AgNPs y el Hg^{2+} .

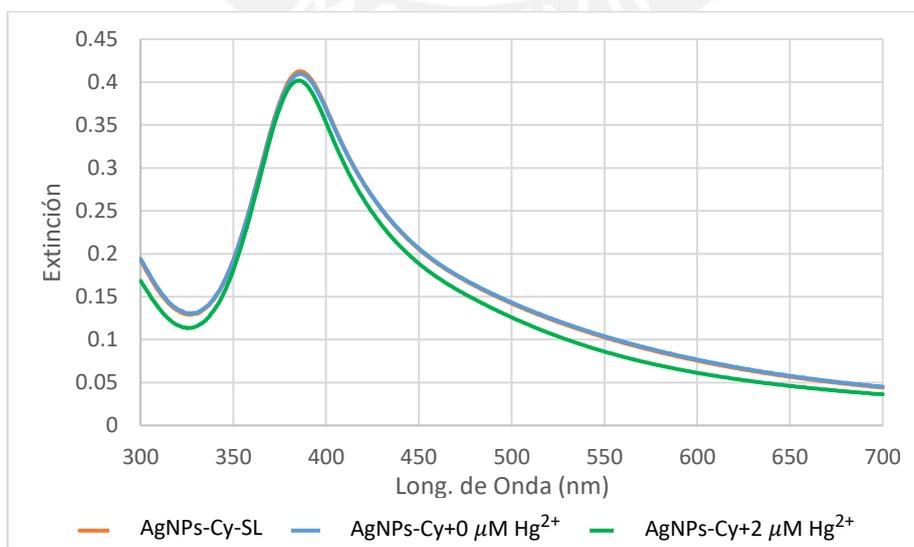


Figura 28: Espectro UV-Vis de AgNPs-Cy_SL frente a $0 \mu\text{M}$ Hg^{2+} y $2 \mu\text{M}$ Hg^{2+} .

Posteriormente, se evaluó la detección de Hg^{2+} con las AgNPs-Cy lavadas (AgNPs-Cy_L). Los espectros resultantes se muestran en la figura 29, en la cual se observa que existe una disminución significativa de la banda plasmónica, además de la aparición de una segunda curva alrededor de los 650 nm, que indica la agregación de las AgNPs. Al interactuar las AgNPs-Cy_L ante Hg^{2+} , los grupos carboxilos y amino forman un complejo con el mercurio de tal forma que permite la agregación de las ANPs-Cy como está descrito en el trabajo de Haibing Li⁴⁰. (Mayores detalles se discuten en el acápite 7.3)

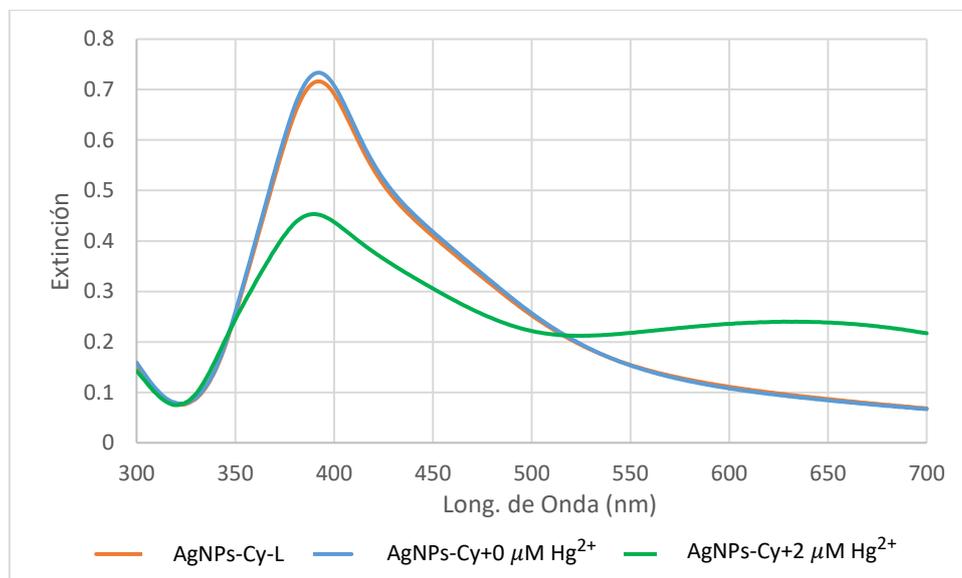


Figura 29: Espectro UV-Vis de AgNPs-Cy_L interactuando frente a $0 \mu\text{M Hg}^{2+}$ y $2 \mu\text{M Hg}^{2+}$.

6.3.2. Optimización del ensayo de detección de Hg^{2+}

6.3.2.1. Evaluación de la cantidad de ligando

Se evaluó el efecto de la cantidad de ligando sobre la banda plasmónica según el apartado 5.2.3. Los resultados se muestran en la figura 30.

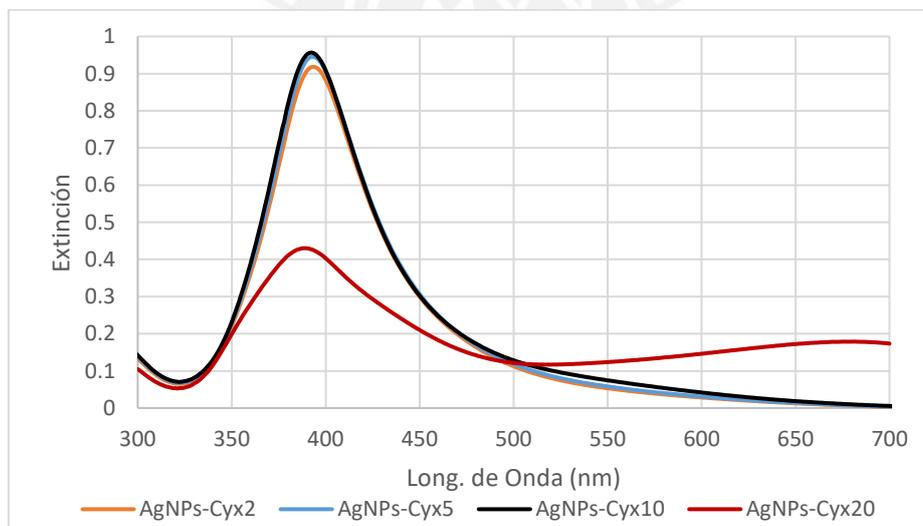


Figura 30: Espectros de AgNPs-Cy con diferentes cantidades de ligando.

En la figura 30 se observa que las AgNPs-Cyx10 presentan una buena intensidad de la banda plasmónica al igual que AgNPs-Cyx5, con la diferencia de que estas últimas son menos estables en el tiempo, pues las AgNPs-Cyx5 se agrupan y precipitan, observándose pequeñas partículas grises en el fondo del recipiente. Por ello, se escogió AgNPs-Cyx10 para los demás ensayos.

6.3.2.2. Efecto de la cantidad de AgNPs-Cy en la detección de Hg^{2+}

Para observar el efecto de la cantidad de AgNPs-Cyx10 ante diferentes concentraciones de Hg^{2+} , se siguió el protocolo descrito en el apartado 5.2.7. Se obtuvieron los resultados que se muestran en la figura 31.

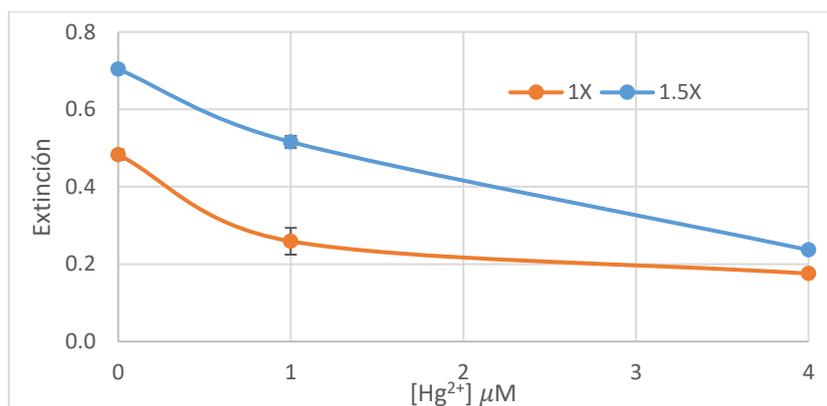


Figura 31: Gráfica del efecto de la cantidad de AgNPs-Cyx10 en la detección de Hg^{2+} .

En la figura 31 se observa que 1X de AgNPs-Cyx10 satura desde $1 \mu M$ de Hg^{2+} . Para realizar el análisis es preciso tener un mayor rango de saturación para el sensor de AgNPs-Cy, por esta razón se eligió 1.5X, pues además presenta errores pequeños y permite ampliar el rango de detección para diferentes cantidades de Hg^{2+} a ser evaluadas.

6.3.2.3. Evaluación del tiempo de incubación para la detección de Hg^{2+}

Para la evaluación del tiempo de incubación, se tomaron primeramente tiempos relativamente largos: 5, 10, 15 y 20 min. Los resultados se muestran en la figura 32.

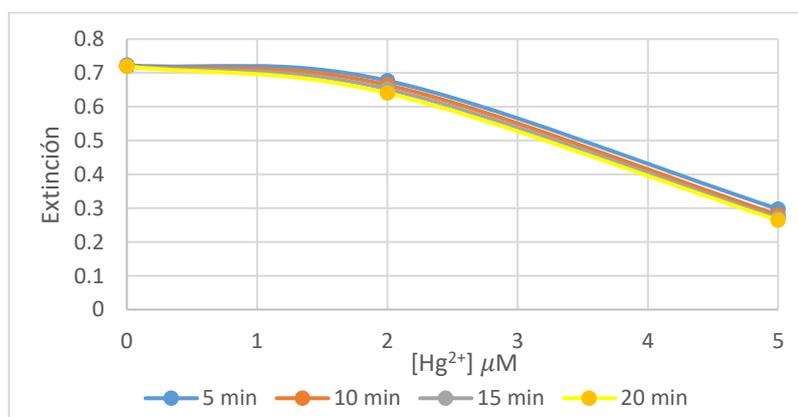


Figura 32: Gráficos de concentración de Hg^{2+} versus absorbancia, para los tiempos 5, 10, 15 y 20 min.

En la figura 32 se observa que, para todos los tiempos de incubación, la respuesta es similar frente a las diferentes concentraciones de Hg^{2+} , pero para tiempos pequeños existen grandes variaciones para las concentraciones intermedias del rango de trabajo. Por otro lado, a 20 min las variaciones son pequeñas y para tiempos mayores a 20 min no se observa ninguna diferencia significativa, por lo que se eligió 20 min como tiempo óptimo.

6.3.3. Curva de calibración de Hg^{2+} para el sensor de AgNPs-Cy mediante espectrofotometría UV-Vis

Para la realización de la curva de la calibración, se emplearon los parámetros previamente establecidos como son la cantidad de ligando en las AgNPs-CyNH₂x10, cantidad de NPs de 1.5X y tiempo de incubación de 20 minutos. Las mediciones se realizaron por triplicado. Los resultados se muestran en la figura 33.

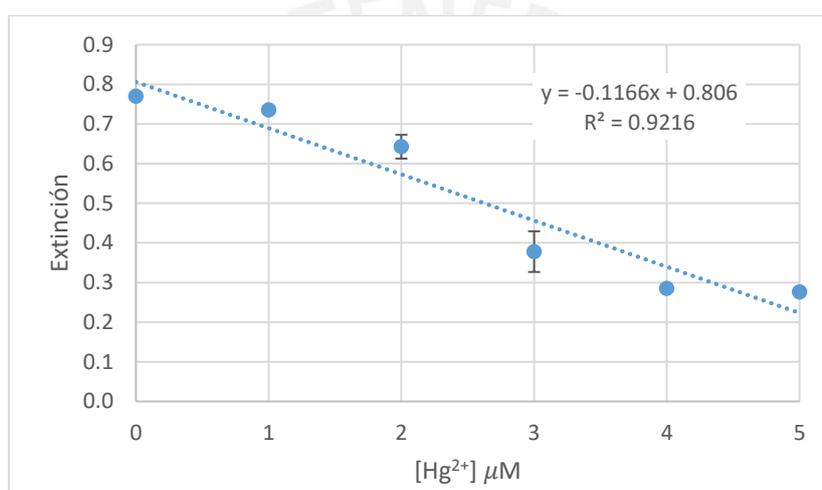


Figura 33: Curva de calibración de Hg^{2+} para el sensor de AgNPs-Cyx10.

De los resultados mostrados en la figura 33, se puede observar que la curva presenta una linealidad pobre. Se estimó el límite de detección del sensor AgNPs-Cyx10 para la detección de Hg^{2+} , tomando en consideración tres veces la desviación estándar de la concentración 0 μM de Hg^{2+} . Se obtuvo un valor de límite de detección de 441 nM.

6.3.4. Evaluación de la detección de Hg^{2+} en presencia de iones interferentes

Se realizó la evaluación de los iones interferentes siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 5.2.8. Se consideraron algunos iones que se encuentran comúnmente en el agua como Ca^{2+} , Na^+ , Mg^{2+} , CO_3^{2-} , Cl^- y NO_3^- , además de otros metales pesados como Pb^{2+} , Cd^{2+} , Fe^{3+} , Cr^{3+} , Zn^{2+} , Sr^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} y Cu^{2+} . Se realizó este ensayo empleando el método de ausencia y presencia de Hg^{2+} para una concentración final de 5 μM . Se empleó una concentración de las sales interferentes de 20 μM para cada una de ellas, tomando en consideración la concentración a los iones que dan la dureza al agua que son el calcio y el magnesio. Los resultados se muestran en la figura 34, en ella se observa que el sensor presenta buena selectividad ante los iones estudiados excepto para Ni^{2+} y Cu^{2+} , en el que el sensor presenta respuesta en ausencia de Hg^{2+} . Por otro lado, se observa que existe una

anomalía para el caso del ion Fe^{3+} en presencia de Hg^{2+} , una explicación detallada a estos comportamientos por parte del sensor AgNPs-Cy se encuentra en el apartado 7.4.

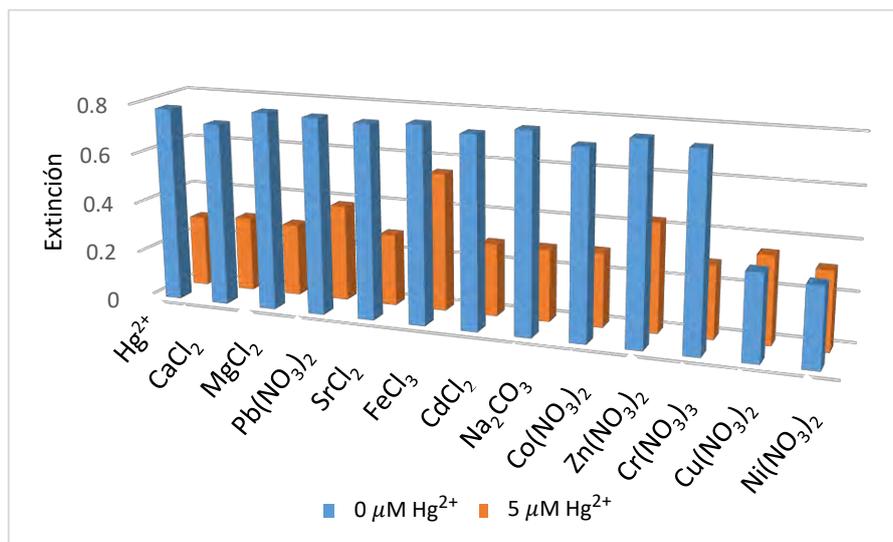


Figura 34: Diagrama de barras de diferentes sales utilizadas como interferentes en la detección de Hg^{2+} .

6.3.5. Ensayo de detección de Hg^{2+} en muestras de agua reales

Se realizó el ensayo siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 5.2.9. Las características de las muestras de agua de manantial empleadas se muestran en la tabla 2.

Los resultados del ensayo se muestran en la figura 35. Se emplearon $75 \mu\text{L}$ de agua de manantial 1 y $750 \mu\text{L}$ de agua de manantial 2 en el ensayo. Cabe resaltar que se emplearon diferentes cantidades de las aguas de manantial en los ensayos debido al diferente contenido de sales disueltas en cada muestra. Se observa que la respuesta del sensor AgNPs-Cy para el 0Hg^{2+} se encuentra dentro del error experimental para todas las muestras, además no se observa un efecto apreciable producto de la matriz. Por otro lado, se observa una leve variación de la respuesta del sensor en presencia de Hg^{2+} .

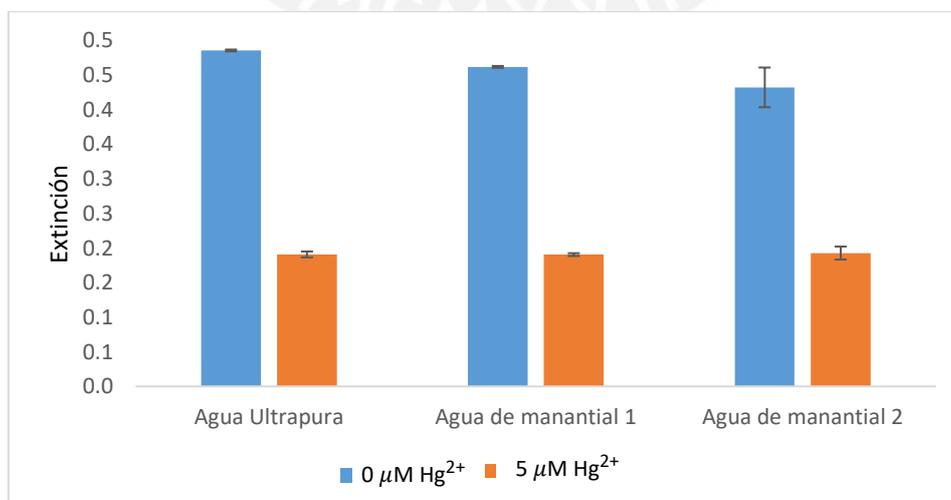


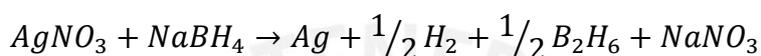
Figura 35: Comparación de la respuesta a la detección de Hg^{2+} por parte del sensor AgNPs-Cy en muestras de agua reales.

7. Discusión de resultados

7.1. Síntesis y caracterización de AgNPs

Dados los objetivos planteados el presente trabajo, este se basó en tres etapas principales: la síntesis de AgNPs, funcionalización de las AgNPs con ligandos sulfurados cortos y su posterior uso en la detección de Hg^{2+} en agua. Para llevar a cabo la síntesis, se usó el proceso modificado del método de Creighton en el cual se utiliza $AgNO_3$ como precursor de las AgNPs y $NaBH_4$ como agente reductor²⁸. Se obtuvieron AgNPs esféricas con un tamaño promedio de 31 ± 8 nm según el análisis de micrografías TEM. El máximo de la banda plasmónica apareció entre 395 ± 3 nm para diferentes lotes, que es congruente con las referencias que indican que la banda plasmónica para las AgNPs esféricas aparecen alrededor de los 400 nm²⁵.

La reacción para la síntesis de las AgNPs se lleva a cabo mediante la reacción química⁴⁷:



La reducción de iones Ag por el borohidruro de sodio es inicialmente muy rápida, especialmente cuando este se encuentra en exceso. Por esta razón, la velocidad y uniformidad en la agitación, así como el control de la temperatura (mantener la temperatura baja) tienen efectos en la banda LSPR, pudiendo hacer que sea ancha y poco intensa cuando se realiza la síntesis a temperatura ambiente. Además, se ha reportado que el tamaño y morfología de las AgNPs dependen de diversos parámetros como la relación entre la plata y el borohidruro, el pH y la exposición a la luz^{47,48,51-59}. Por lo tanto, la producción de AgNPs es muy sensible a las condiciones de preparación, por lo que los coloides de Ag fueron preparados con extremo cuidado y bajo condiciones controladas de temperatura, pH, protección de la luz y velocidad de agitación.

7.2. Funcionalización de las AgNPs con los ligandos sulfurados cortos

El proceso de funcionalización de las AgNPs con $CyNH_2$ se llevó a cabo como se describió en el apartado 5.2.2. Se ajustó el pH de las AgNPs de su pH inicial de alrededor de 9 a un pH de 4 antes de adicionar el ligando. El pH del coloide luego de la adición del ligando fue 4. Los resultados mostrados en la Fig. 18, muestran que las AgNPs- $CyNH_2$ agregan a pHs mayores a 6. Por otro lado, según ha reportado Rajkumar y col.³⁶ la unión ocurre mediante la interacción de los grupos tioles de la $CyNH_2$ con la superficie de las AgNPs, esta interacción es del tipo quimisorción. Las AgNPs- $CyNH_2$ son capaces de resistir soluciones de $Ca(II)$ a concentraciones de 5 mM mientras que las AgNPs (sin funcionalizar) se vuelven inestables a concentraciones mayores a 0.5 mM (Fig. 15).

El proceso de funcionalización de las AgNPs con Cy se llevó a cabo como se describió en el apartado 5.2.3. El pH final del coloide fue 8, debido a que durante el proceso de eliminación del exceso de ligando fue necesario ajustar el agua de lavado a pH 8, pues como se muestra en la Fig. 26 las AgNPs-Cy agregan a un pH menor a 8. Debido a que el pK_a del grupo amino tiene un valor de 8.18²⁸ y en medio ácido se encuentra protonado con lo cual puede formar puentes de hidrógeno y hacer que agreguen las AgNPs⁶⁶. Estos resultados son diferentes a los obtenidos por Rajkumar y col.³⁶ pues en su trabajo no observaron agregación a pH ácido, tan solo observaron un pequeño desplazamiento de la banda hacia menores longitudes de onda al aumentar el pH.

7.3. Detección de Hg²⁺ con AgNPs funcionalizadas

Primeramente, se evaluó un protocolo inicial (5.2.6. a) tomando en consideración la concentración de Hg²⁺, tiempo de incubación y cantidad de AgNPs-CyNH₂, observándose una respuesta favorable en la detección de Hg²⁺. Este protocolo se mejoró y optimizó (5.2.6. b) para poder emplear el sensor en la cuantificación de Hg²⁺. La optimización del sensor AgNPs-CyNH₂ para la detección de Hg²⁺ se llevó a cabo mediante la evaluación de los siguientes parámetros: a) cantidad de ligando, b) cantidad de AgNPs-CyNH₂x10 y c) tiempo de incubación en la detección de Hg²⁺. Con el protocolo optimizado, se realizó una curva de calibración por espectrofotometría UV-Vis.

El sensor de AgNPs-CyNH₂ mostró un límite de detección de 108 nM y un rango lineal de entre 0 y 20 μM de Hg²⁺.

Una explicación del mecanismo de la interacción entre las AgNPs-CyNH₂ y el Hg²⁺ ha sido dado por Chakraborty y col.⁸ en el cual se produciría un intercambio del ligando entre las AgNPs y el Hg²⁺ que es tiofílico, desprotegiendo la superficie de las AgNPs y dejándola expuesta para que ocurra la reacción redox entre la Ag y Hg²⁺. Esta reacción da lugar a la formación de una nanoaleación^{61,62} (nanoamalgama) que ocasiona un cambio en la banda LSPR. La reacción entre las AgNPs y el Hg²⁺ ocurriría de la siguiente manera^{8,63}:



El proceso que da lugar a las nanoaleaciones de Ag@Hg se desarrolla en los siguientes pasos: primero, una rápida adsorción de los átomos de Hg sobre las AgNPs; segundo, una difusión rápida de los átomos de Hg dentro de las AgNPs; tercero, una mayor difusión de átomos de Hg que lleva a la formación de Ag y Hg uniformemente distribuido en nanoaleaciones de Ag@Hg esféricas⁶².

Una representación esquemática del mecanismo de sensado de Hg²⁺ por parte de las AgNPs-CyNH₂ se muestra en la figura 5.

Por otro lado, para llevar a cabo la detección de Hg²⁺ con el sensor de AgNPs-Cy, se requirió el empleo de un buffer a pH 8 pues, como se mostró en la Fig. 26, las AgNPs-Cy al ser expuestas a un medio ligeramente ácido o neutro se agregan, debido a que la amina de la Cy toma su forma iónica positiva lo que facilita la formación de puentes hidrógeno con los grupos carboxílicos de otras moléculas y las AgNPs se aglomeran²⁸. El que la AgNPs-Cy precipitaran en medio ácido se presentaba como un inconveniente pues las soluciones de Hg²⁺ se encontraban en medio ácido (solución HNO₃ 0.25%). Para la optimización del sensor AgNPs-Cy en la detección de Hg²⁺, se evaluaron los siguientes parámetros: a) la cantidad de ligando a emplear b) la cantidad de AgNPs-Cyx10 y c) el tiempo de incubación. Con el protocolo optimizado (5.2.7. a), se obtuvo una curva de calibración. El sensor de AgNPs-Cy mostró un límite de detección del orden de 440 nM y un rango de detección de entre 0 y 5 μM de Hg²⁺, que es la concentración a la cual el sensor se satura, con una linealidad baja (Fig. 33).

Rajkumar y col.³⁶ han reportado un sensor de Hg²⁺ en base a AgNPs-Cy. En dicho estudio, la banda LSPR desaparece progresivamente en presencia del analito y el mecanismo propuesto es análogo al del sensor basado en AgNPs-CyNH₂ previamente descrito (formación de una amalgama de plata). Ese reporte³⁶ difiere de los resultados mostrados en este trabajo, que evidencian la agregación de las AgNPs en presencia de

Hg^{2+} mediante la aparición de un segundo pico alrededor de los 650 nm (Fig. 29). Esta diferencia se puede deber al proceso de síntesis, pues Rajkumar adiciona la Cy a la solución de AgNO_3 y luego adiciona esta mezcla a la solución de NaBH_4 ; por otro lado, cabe resaltar que emplea 3.3 veces menos ligando que nosotros, además no realiza ningún proceso de lavado para eliminar el exceso de ligando. Al pH del ensayo (alrededor de 8), el grupo carboxilo de la cisteína (punto isoeléctrico 5.07²⁸) se encuentra desprotonado, estabilizando las AgNPs-Cy⁶⁴ (Fig. 36), libre para interactuar con el analito.

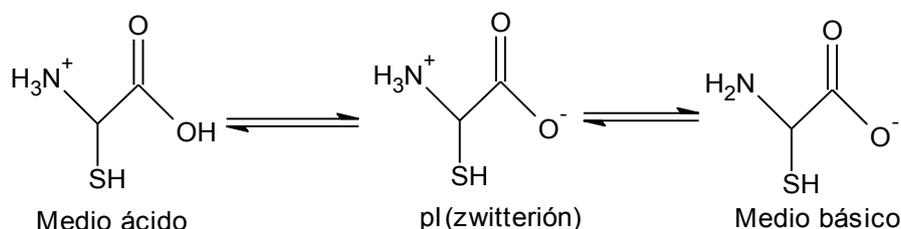


Figura 36: Estructuras de las tres formas iónicas de la Cy dependiendo del pH.

Por otro lado, en la revisión presentada por Balme y col.⁵⁹ y el trabajo de Haibin Li y col.⁴⁰ muestra cómo las AgNPs-Cy interactúan con el mercurio mediante un mecanismo de agregación tal como se muestra en la figura 37, en donde mediante interacciones tipo quimisorción se produce la agregación de las AgNPs mediante el grupo carboxilato de la Cy con el ion metálico, en la relación de dos Cy por cada ion metálico, lo cual sería congruente la aparición de un segundo pico alrededor de los 650 nm y el cambio de coloración de amarillo a azul violeta y posteriormente incoloro producto de la agregación.

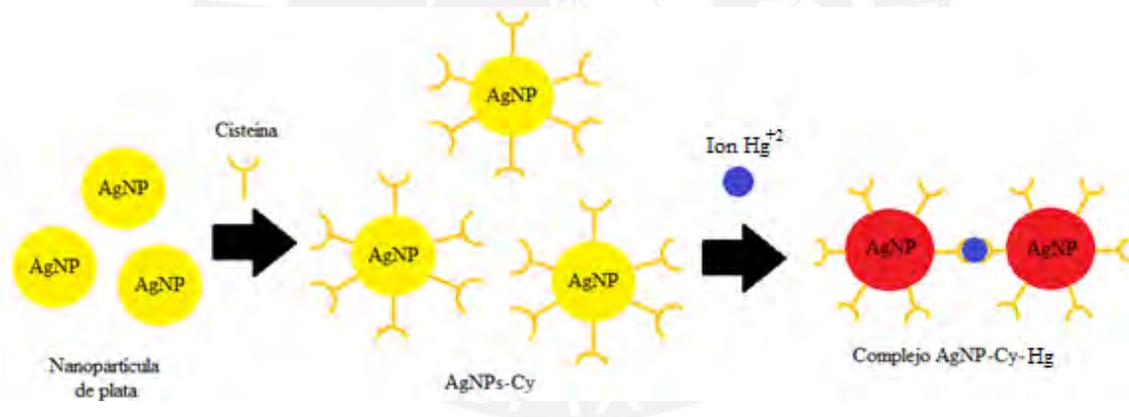


Figura 37: Representación esquemática de la interacción entre las AgNPs-Cy y el Hg^{2+} . Adaptado de Balme y col.⁵⁹

Mayor detalle entre la interacción de las AgNPs-Cy y el Hg^{2+} ha sido reportado por Zhan y col.⁶⁶, tal como se muestra en la figura 38, en la que se observa como los grupos amino y carboxilato de la cisteína se unen al Hg^{2+} .

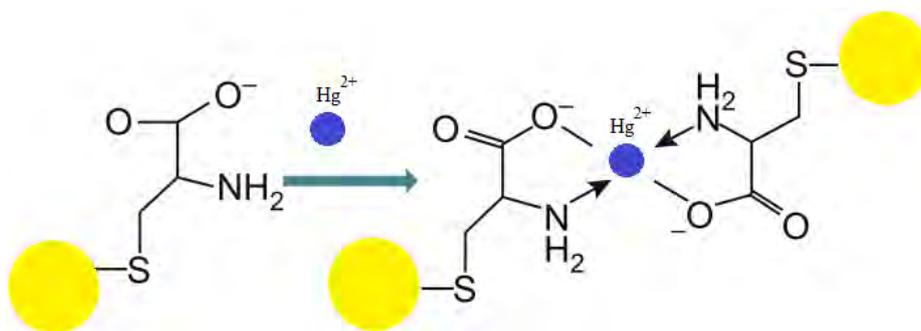


Figura 38: Representación esquemática de la formación de compuestos de coordinación entre cisteína (absorbida en AgNPs) con Hg^{2+} . Adaptado de Zhan y col.⁶⁶

7.4. Estudio de interferentes y detección de Hg^{2+} en muestras de aguas reales

El estudio de los interferentes se llevó a cabo según como se describió en el apartado 5.2.8. Para el caso de las AgNPs-CyNH₂, se obtuvo en general buenos resultados para todos los iones estudiados, con la salvedad del magnesio con el que se observó que existía respuesta por parte del sensor en ausencia de Hg^{2+} . Este hecho se puede explicar debido a las interacciones entre las AgNPs-CyNH₂ y magnesio, por causa de las tendencias de estabilidad de los complejos metálicos por parte de las aminas de las CyNH₂, que se comportarían como bases duras por lo cual presentarían mayor afinidad por un ácido duro⁶⁵ como lo es el ion Mg^{2+} en lugar de un ácido blando como el Hg^{2+} . La respuesta por parte del magnesio limitaría el uso del sensor en aguas duras, pues tendrían un elevado contenido de calcio y magnesio.

Para el sensor de AgNPs-Cy, se observó interferencias debido a la poca selectividad de los grupos carboxilo y amino de la cisteína. Se observó respuesta para Cu y Ni. Este comportamiento se puede explicar debido al efecto quelato de los grupos amino y carboxilato frente a dichos metales. Los iones Cu^{2+} y Ni^{2+} son ácidos con comportamiento intermedio⁶⁵, es decir, que pueden actuar como ácidos duros o blandos dependiendo del ligando con el cual estén interactuando. Por ello, inducen agregación de las AgNPs-Cy. Esta observación es consistente con los reportes de otros sensores de cationes (Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} , Cr^{3+}) basados en cisteína⁵⁹, en los cuales al variar las condiciones del ensayo puede ser específico para la detección de un analito en particular.

Por otro lado, respecto a los ensayos de detección de Hg^{2+} en muestras de aguas reales como se describió en el apartado 5.2.9, se encontró que ambos sensores soportan una dureza limitada por lo que se evaluaron en agua de manantial. Se comprobó que el sensor basado en AgNPs-CyNH₂ presenta mayor resistencia a la dureza del agua (contenido de calcio y magnesio) que el sensor basado en AgNPs-Cy, pues cuando se evaluaron los interferentes el sensor de AgNPs-CyNH₂ soportó una mayor concentración de calcio, con excepción del magnesio con el cual aún en bajas concentraciones da respuesta. Por otro lado, ambos sensores dan buenos resultados en la detección de Hg^{2+} , además de tener errores pequeños.

8. Conclusiones y recomendaciones

Se estandarizó el protocolo de síntesis de AgNPs esféricas por el proceso modificado del método de Creighton. Se obtuvo AgNPs con un diámetro promedio de 31 nm de acuerdo a la caracterización por análisis de las imágenes TEM.

Se implementó y optimizó un protocolo de funcionalización para las AgNPs con los ligandos cisteamina y cisteína para la detección de Hg^{2+} en agua.

Se estableció y optimizó un protocolo de cuantificación de Hg^{2+} en agua por espectrofotometría UV-Vis para cada sensor en estudio. Se logró obtener un límite de detección de 108 nM para el sensor de AgNPs-CyNH₂ con un tiempo de incubación de 2 min y un límite de detección de 441 nM para el sensor de AgNPs-Cy con un tiempo de incubación de 20 min. Por otro lado, aunque no se ha podido llegar a detectar cantidades de Hg^{2+} por debajo de los límites de detección establecidos por las entidades reguladoras, se ha podido desarrollar una metodología simple, práctica y rápida para la detección de Hg^{2+} .

El sensor basado en AgNPs-CyNH₂ presenta buena selectividad para la mayoría de iones interferentes estudiados. Por otro lado, el sensor de AgNPs-Cy presenta una selectividad limitada debido a los grupos funcionales de la cisteína que son poco selectivos e inducen la agregación con iones metálicos como el Cu^{2+} y Ni^{2+} . Además, cabe resaltar que ambos sensores soportan una dureza limitada.

Se recomienda evaluar la eliminación de los interferentes que afectan a cada sensor para evitar falsos positivos en los análisis y reducir la dureza mediante el uso de intercambiadores iónicos conocidos como ablandadores, que reemplazan los iones calcio y magnesio por otros iones como por ejemplo el sodio o potasio.

Se recomienda evaluar las metodologías de detección de Hg^{2+} estudiadas para que puedan ser adaptadas a sistemas portátiles de espectrofotometría UV-Vis y pueden realizarse ensayos en campo, *in situ*.

9. Referencias bibliográficas

- (1) Kim, H. N.; Ren, W. X.; Kim, J. S.; Yoon, J. Fluorescent and Colorimetric Sensors for Detection of Lead, Cadmium, and Mercury Ions. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 8, 3210–3244.
- (2) Nolan, E. M.; Lippard, S. J. Tools and Tactics for the Optical Detection of Mercuric Ion. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 9, 3443–3480.
- (3) Botasini, S.; Heijo, G.; Méndez, E. Toward Decentralized Analysis of Mercury (II) in Real Samples . A Critical Review on Nanotechnology-Based Methodologies. *Anal. Chim. Acta* **2013**, *800*, 1–11.
- (4) Ratte, H. T. Bioaccumulation and toxicity of silver compounds : A review. *Environ. Toxicol. Chem.* **1999**, *18*, 1, 89–108.
- (5) Clarkson, T. W. The Toxicology of Mercury. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **1997**, *34*, 3, 369–403.
- (6) Goldman, L. R.; Shannon, M. W. Technical Report : Mercury in the Environment: *Am. Acad. Pediatr.* **2001**, *108*, 1, 197–205.
- (7) Holmes, P.; James, K. A. F.; Levy, L. S. Science of the Total Environment Is Low-Level Environmental Mercury Exposure of Concern to Human Health? *Sci. Total Environ.* **2009**, *408*, 2, 171–182.
- (8) Bhattacharjee, Y.; Chakraborty, A. Label-Free Cysteamine-Capped Silver Nanoparticle-Based Colorimetric Assay for Hg(II) Detection in Water with Subnanomolar Exactitude. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2014**, *2*, 9, 2149–2154.
- (9) Infusa, C. El caso de los enfermos de Minamata. Revisado el 18 de enero del 2019 en: www.infusa/enfremedad_por_mercurio/enfermedad_de_minamata.html
- (10) Sönnichsen, C.; Reinhard, M.; Liphardt, J.; Alivisatos, A. P. A Molecular Ruler Based on Plasmon Coupling of Single Gold and Silver Nanoparticles. *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 6, 741–745.
- (11) Lu, K. Nanoparticles Materials - Synthesis, Characterization, and Processing, Wiley-VCH, EE.UU, 2013, first, 2-189.
- (12) Kretschmer, F.; Mühlig, S.; Hoepfner, S.; Winter, A.; Hager, M. D.; Rockstuhl, C.; Pertsch, T.; Schubert, U. S. Survey of Plasmonic Nanoparticles: From Synthesis to Application. *Part. Syst. Charact.* **2014**, *31*, 7, 721–744.
- (13) Ledwith, D. M.; Aherne, D.; Kelly, J. M. Approaches to the Synthesis and Characterization of Spherical and Anisotropic Silver Nanomaterials. In *Metallic Nanomaterials*; Kumar, C., Ed.; Wiley-VCH, USA, 2009; 99–110.
- (14) Kelly, K. L.; Coronado, E.; Zhao, L. L.; Schatz, G. C. The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment. *J.*

Phys. Chem. B **2003**, 107, 668–677.

- (15) Oliveira, E.; Núñez, C.; Santos, H. M.; Fernández-Lodeiro, J.; Fernández-Lodeiro, A.; Capelo, J. L.; Lodeiro, C. Revisiting the Use of Gold and Silver Functionalised Nanoparticles as Colorimetric and Fluorometric Chemosensors for Metal Ions. *Sensors Actuators, B Chem.* **2015**, 212, 297–328.
- (16) Wang, T. C.; Rubner, M. F.; Cohen, R. E. Polyelectrolyte Multilayer Nanoreactors for Preparing Silver Nanoparticle Composites : Controlling Metal Concentration and Nanoparticle Size. *Langmuir* **2002**, 18, 8, 3370–3375.
- (17) Malynych, S. Z.; Chumanov, G.; Malynych, S. Z.; Chumanov, G. Deposition of Silver Island Films on Chemically Modified Surfaces Vacuum Deposition of Silver Island Films on Chemically Modified Surfaces. *J. Vac. Sci. Technol. A* **2003**, 21, 3, 723–727.
- (18) Mafune, F.; Kohno, J.; Takeda, Y.; Kondow, T. Structure and Stability of Silver Nanoparticles in Aqueous Solution Produced by Laser. *J. Phys. Chem. B* **2000**, 104, 35, 8333–8337.
- (19) Abid, J. P.; Wark, A. W.; Brevet, P. F.; Girault, H. H. Preparation of Silver Nanoparticles in Solution from a Silver Salt by Laser. *Chem. Commun.* **2002**, 792–793.
- (20) Zhu, J.; Liu, S.; Palchik, O.; Koltypin, Y.; Gedanken, A. Shape-Controlled Synthesis of Silver Nanoparticles by Pulse Sonoelectrochemical Methods. *Langmuir* **2000**, 16, 16, 6396–6399.
- (21) Monge, M. Nanopartículas de Plata : Métodos de Síntesis en disolución y propiedades bactericidas. *Investig. Quim.* **2009**, 8, 33–41.
- (22) Lee, P. C.; Meisel, D. Adsorption and Surface-Enhanced Raman of Dyes on Silver and Gold Sols. *J. Phys. Chem.* **1982**, 86, 17, 3391–3395.
- (23) Henglein, A.; Giersig, M. Formation of Colloidal Silver Nanoparticles : Capping Action of Citrate. *J. Phys. Chem. B* **1999**, 103, 2, 9533–9539.
- (24) Pillai, Z. S.; Kamat, P. V. What Factors Control the Size and Shape of Silver Nanoparticles in the Citrate Ion Reduction Method? *J. Phys. Chem. B* **2004**, 108, 945–951.
- (25) Creighton, J. A.; Blatchford, C. G.; Albrecht, M. G. Plasma Resonance Enhancement of Raman-Scattering by Pyridine Adsorbed on Silver or Gold Sol Particles of Size Comparable to the Excitation Wavelength. *J. Chem. Soc. Trans. Ii* **1979**, 75, 790–798.
- (26) Murphy, C. J.; Gole, A. M.; Hunyadi, S. E.; Stone, J. W.; Sisco, P. N.; Alkilany, A.; Kinard, B. E.; Hankins, P.; Murphy, C. J. Chemical Sensing and Imaging with Metallic Nanorods. *Chem. Commun.* **2008**, 544–557.

- (27) Obare, S. O.; Hollowell, R. E.; Murphy, C. J. Sensing Strategy for Lithium Ion Based on Gold Nanoparticles. *Langmuir* **2002**, *18*, 26, 10407–10410.
- (28) Ravindran A., Priya S., Chandrasekaran N., Mukherjee A. Differential interaction of silver nanoparticles with cysteine. *Journal of Experimental Nanoscience* **2013**, *8*, 4, 589–595.
- (29) Vasquez, G.; Hernández, Y.; Coello, Y. Portable Low-Cost Instrumentation for Monitoring Rayleigh Scattering from Chemical Sensors Based on Metallic Nanoparticles. *Scientific Reports* **2018**, *8*, 14903–14912.
- (30) Terenteva, E. A.; Apyari, V. V.; Kochuk, E. V.; Dmitrienko, S. G.; Zolotov, Y. A. Use of Silver Nanoparticles in Spectrophotometry. *J. Anal. Chem.* **2017**, *72*, 11, 1138–1154.
- (31) Pearson, R. G. Hard and Soft Acids and Bases. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 22, 3533–3539.
- (32) Li, Y.; Chen, C.; Li, B.; Sun, J.; Wang, J.; Gao, Y. Elimination Efficiency of Different Reagents for the Memory Effect of Mercury Using ICP-MS W. *J. Anal. At. Spectrom.* **2006**, 94–96.
- (33) Leermakers, M.; Baeyens, W.; Quevauviller, P. Mercury in Environmental Samples : Speciation , Artifacts and Validation. *Trends Anal. Chem.* **2005**, *24*, 5, 383–393.
- (34) Fan, Y.; Liu, Z.; Wang, L.; Zhan, J. Synthesis of Starch-Stabilized Ag Nanoparticles and Hg²⁺ Recognition in Aqueous Media. *Nanoscale Res. Lett.* **2009**, *4*, 1230–1235.
- (35) Wang, G. L.; Zhu, X. Y.; Jiao, H. J.; Dong, Y. M.; Li, Z. J. Ultrasensitive and Dual Functional Colorimetric Sensors for Mercury (II) Ions and Hydrogen Peroxide Based on Catalytic Reduction Property of Silver Nanoparticles. *Biosens. Bioelectron.* **2012**, *31*, 1, 337–342.
- (36) Nidya, M.; Umadevi, M.; Rajkumar, B. J. M. Structural, Morphological and Optical Studies of l-Cysteine Modified Silver Nanoparticles and Its Application as a Probe for the Selective Colorimetric Detection of Hg²⁺. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2014**, *133*, 265–271.
- (37) Farhadi, K.; Forough, M.; Molaei, R.; Hajizadeh, S.; Rafipour, A. Highly Selective Hg²⁺ Colorimetric Sensor Using Green Synthesized and Unmodified Silver Nanoparticles. *Sensors Actuators, B Chem.* **2012**, *161*, 1, 880–885.
- (38) Ravi, S. S.; Christena, L. R.; Saisubramanian, N.; Anthony, S. P. Green Synthesized Silver Nanoparticles for Selective Colorimetric Sensing of Hg²⁺ in Aqueous Solution at Wide pH Range. *Analyst* **2013**, *138*, 4370–4377.
- (39) Gao, S.; Jia, X.; Chen, Y. Old Tree with New Shoots: Silver Nanoparticles for Label-Free and Colorimetric Mercury Ions Detection. *J. Nanoparticle Res.* **2013**,

15, 1, 1-9.

- (40) Li, H.; Bian, Y. Selective Colorimetric Sensing of Histidine in Aqueous Solutions Using Cysteine Modified Silver Nanoparticles in the Presence of Hg^{2+} . *Nanotechnology* **2009**, 20, 14, 145502.
- (41) Dean, J. A. Lange's Handbook of Chemistry, McGRAW-HILL INC. EE. UU, 1999, Fifteenth, sección 3-5.
- (42) Monteagudo F. A. 2001. Evaluación de la contaminación por mercurio en población de mineros artesanales de oro de la comunidad de Santa Filomena – Ayacucho – Perú durante el periodo agosto 2000-setiembre 2001. Tesis de título profesional de Químico Farmacéutico. UNMSM. Lima. Perú.
- (43) Pantoja, F.; Álvarez, R.; Rodríguez, A. Tecnologías apropiadas para disminuir la contaminación ocasionada por mercurio en la minería del oro. *Revista de Metalurgica* 2005; 41, 3, 194-203.
- (44) Fawell, J. K.; Magara, Y.; Gidding, M.; Ohanian, E.; Tof, P. Guías Para La Calidad Del Agua Potable-Primer Apéndice, Tercera; 2006.
- (45) Sánchez, E. C. Reglamento de La Calidad Del Agua Para Consumo Humano, Primera; MINSA. Lima, 2011.
- (46) Schopf, C.; Martín, A.; Iacopino, D. Plasmonic Detection of Mercury via Amalgam Formation on Surface-Immobilized Single Au Nanorods. *Sci. Technol. Adv. Mater.* **2017**, 18, 1, 60–67.
- (47) Solomon, S. D.; Mulfinger, L.; Bahadory, M.; Jeyarajasingam, A. V.; Rutkowsky, S. a.; Boritz, C. Synthesis and Study of Silver Nanoparticles. *J. Chem. Educ.* **2007**, 84, 2, 322.
- (48) Evanoff, D. D.; Chumanov, G. Synthesis and Optical Properties of Silver Nanoparticles and Arrays. *ChemPhysChem* **2005**, 6, 7, 1221–1231.
- (49) Hyning, D. L. Van; Zukoski, C. F. Formation Mechanisms and Aggregation Behavior of Borohydride Reduced Silver Particles. *Langmuir* **1998**, 14, 24, 7034–7046.
- (50) Dirk L. Van Hyning, Walter G. Klemperer, C. F. Z. Characterization of Colloidal Stability during Precipitation Reactions. *Langmuir* **2001**, 17, 11, 3120–3127.
- (51) Shirtcliffe, N.; Nickel, U.; Schneider, S. Reproducible Preparation of Silver Sols with Small Particle Size Using Borohydride Reduction: For Use as Nuclei for Preparation of Larger Particles. *J. Colloid Interface Sci.* **1999**, 211, 122–129.
- (52) Bonsak, J.; Mayandi, J.; Marstein, E. S.; Mahalingam, U. Chemical Synthesis of Silver Nanoparticles for Solar Cell Applications. *Phys. Status Solidi C* **2011**, 8, 3, 924–927.

- (53) Zielinska, A.; Skwarek, E.; Zaleska, A.; Gazda, M.; Hupka, J. Preparation of Silver Nanoparticles with Controlled Particle Size. *Procedia Chem.* **2009**, 1, 1560–1566.
- (54) He, R.; Qian, X.; Yin, J.; Zhu, Z. Preparation of Polychrome Silver Nanoparticles in Different Solvents. *J. Mater. Chem.* **2002**, 12, 12, 3783–3786.
- (55) Nzekwe, I. T.; Agubata, C. O.; Umeyor, C. E.; Okoye, I. E.; Ogwueleka, C. B. Synthesis of Silver Nanoparticles by Sodium Borohydride Reduction Method: Optimization of Conditions for High Anti-Staphylococcal Activity. *British Journal of Pharmaceutical Research* **2017**, 14, 5, 1–9.
- (56) Chitra, K.; Annadurai, G. Antibacterial Activity of pH-Dependent Biosynthesized Silver Nanoparticles against Clinical Pathogen. *Biomed Res. Int.* **2014**, 1–6.
- (57) Lee, S.; Chang, S.; Lai, Y.; Lin, C.; Tsai, C. Effect of Temperature on the Growth of Silver Nanoparticles Using Plasmon-Mediated Method under the Irradiation of Green LEDs. *Materials* **2014**, 7, 7781–7798.
- (58) Wiley B. J., Im S. H., Zhi-Yuan Li, McLellan J., Siekkinen A., X. Y. Maneuvering the Surface Plasmon Resonance of Silver Nanostructures through Shape-Controlled Synthesis. *J. Phys. Chem. B* **2006**, 110, 15666–15675.
- (59) Sabela, M.; Balme, S.; Bechelany, M.; Janot, J. M.; Bisetty, K. A Review of Gold and Silver Nanoparticle-Based Colorimetric Sensing Assays. *Adv. Eng. Mater.* **2017**, 19, 12, 1-7.
- (60) Kim, C.; Parkin, S.; Bharara, M.; Atwood, D. Linear Coordination of Hg (II) by Cysteamine. *Polyhedron* **2002**, 21, 225–228.
- (61) Junling, S.; Duan, A.; Celebioglu, A.; Uyar, T. Real-Time Selective Visual Monitoring of Hg²⁺ Detection at ppt Level : An Approach to Lighting Electrospun Nanofibers Using Gold Nanoclusters. *Scientific reports* **2015**, 5, 10403.
- (62) Liu, Y.; Huang, C. Z. Real-Time Dark-Field Scattering Microscopic Monitoring of the in Situ Growth of Single Ag@Hg Nanoalloys. *ACS Nano* **2013**, 12, 11026–11034.
- (63) Henglein, A. Colloidal Silver Nanoparticles : Photochemical Preparation and Interaction with O₂, CCl₄, and Some Metal Ions. *Chem. Mater.* **1998**, 10, 1, 444–450.
- (64) Mandal, S.; Gole, A.; Lala, N.; Gonnade, R.; Ganvir, V.; Sastry, M. Studies on the Reversible Aggregation of Cysteine-Capped Colloidal Silver Particles Interconnected via Hydrogen Bonds. *Langmuir* **2001**, 17, 20, 6262–6268.
- (65) Huheey, J.; Keiter, E.; Keiter, R. Química Inorgánica-Principios de Estructura y Reactividad, Oxford University Press, México, 1997, Fourth.
- (66) Duan, J.; Zhan, J. Recent developments on nanomaterials-based optical sensors for Hg²⁺ detection. *Science China Materials* **2015**. 58, 3, 223-240.