

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUIMICA



**DESARROLLO DE UN SENSOR BASADO EN NANOPARTÍCULAS DE ORO PARA
LA DETECCIÓN DE MERCURIO (II) EN
DISOLUCIONES ACUOSAS.**

Trabajo Especial de Grado presentado
ante la ilustre Universidad Central de
Venezuela por la Br: **Marie A. La Cruz
González.**, para optar al título de
LICENCIADA EN QUIMICA.

Caracas, 24 de Mayo de 2012

ACTA

Los abajo firmantes designados por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del Trabajo Especial de Grado titulado: "DESARROLLO DE UN SENSOR BASADO EN NANOPARTÍCULAS DE ORO PARA LA DETECCIÓN DE MERCURIO (II) EN DISOLUCIONES ACUOSAS". Presentado por la Br. Marie La Cruz González, certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por nuestra Magna Casa de Estudios para optar por el título de Licenciada en Química.

Dr. José Chirinos
(Tutor)

Dr. Jimmy Castillo
(Tutor)

Dr. Mary Lorena Araujo
(Jurado)

Dr. Vincent Piscitelli
(Jurado)

AGRADECIMIENTOS

Primero que nada quiero dar gracias a Dios, por permitirme culminar con éxito esta meta trazada.

También quiero dar gracias a mis tutores, Dr. José Chirinos y Dr. Jimmy Castillo; son los mejores! Les agradezco muchísimo permitirme realizar este trabajo especial de grado, bajo su asesoramiento y concluir satisfactoriamente con él.

Personalmente le doy gracias a mi madre por estar siempre presente y ser una gran compañera, te quiero inmensamente, gracias por existir. Padre espero que te sientas orgulloso de mi, gracias por todo el apoyo. Marianne hermana, eres de lo más importante para mí; gracias por acompañarme, escucharme, apoyarme, consentirme, etc., etc., etc. Eres la mejor hermana del mundo, te adoro!

Quiero dar las gracias a todos en el laboratorio de espectroscopía láser en especial al profesor Vincent, que me ayudo una infinidad de veces con los equipos; muchachas Virginia y Karina su compañía no tiene precio; Jeniree eres una hermosura de persona y Mayreli (La mía) gracias por estar conmigo en todos los aspectos de mi vida durante este tiempo que estuvimos juntas; muchachas sin ustedes nada hubiese sido tan genial, gracias por la amistad.

Amigas de mi corazón Fran y Pi, ustedes son parte importante de este logro; gracias por los tips para tesis, por estar siempre pendiente de mi y sobre todo por darme esa seguridad de que cada vez que las necesite, ustedes van a estar para mí; esta demás decir que las quiero muchísimo, bueno no; las quiero muchísimo, gracias por todo y espero colegas, que se sientan muy orgullosas de mi.

A todos los que me ayudaron, muchas gracias.

Dedicado a:

El ser que más amo... Mi madre.

RESUMEN.

La contaminación por metales pesados tiene efectos adversos sobre el medio ambiente y también en la salud de los humanos, los vapores de mercurio metálico y de sus derivados orgánicos, afectan diferentes áreas del cerebro y sus funciones asociadas. Las preocupaciones sobre la exposición tóxica al mercurio han motivado la exploración de nuevos métodos para supervisarlo y aunque el desarrollo de nuevas metodologías para la detección de Hg (II) sigue siendo un reto, un posible enfoque es el uso de las nanopartículas (Nps) que proporcionan una alta selectividad para la detección de iones metálicos; debido a las propiedades ópticas, de tamaño y forma que estas presentan.

Las Au-Nps son generadas por ablación láser a una longitud de onda fundamental (532 nm) y a una frecuencia fija de 10 Hz. La ablación se realiza sobre una placa de oro sumergida en una solución acuosa de Dodecil Sulfato de Sodio (SDS). Durante el proceso se ajustaron condiciones como: concentración del estabilizante, energía del láser y tiempo de ablación, con el fin de obtener los mejores espectros de absorción y distribución de tamaños de las Au-Nps generadas.

A las soluciones de Au-Nps resultantes se les aplicó un flujo de Hg^0 , producto de la reducción de soluciones acuosas de Hg^{2+} , empleando como agente reductor NaBH_4 . Cuando las Au-Nps se ponen en contacto con átomos de Hg^0 se produce una reacción inmediata entre las especies lo que da como resultado una disminución del valor de absorbancia de la Au-Nps con respecto a la medida inicial. Aprovechando esta propiedad de las Au-Nps se pudo construir una curva de calibración y con ella evaluar las figuras de mérito para el sistema; con dichos resultados, se puede concluir que este sensor es útil para la determinación cuantitativa de mercurio, el mismo presenta buena sensibilidad, y un límite de detección (LOD) de 175,0ppt lo que hace que éste método pueda ser comparado con los métodos analíticos de detección convencionales.

CONTENIDO

1. FUNDAMENTOS TEORICOS	3
1.1. MERCURIO.....	3
• Absorción de mercurio.....	4
• Efectos sobre la salud	5
1.2. DETERMINACION DE MERCURIO	6
1.2.1. QUIMIOSENSORES.....	6
• Nps de Oro	11
1.2.2.1. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LAS NPS	15
• Propiedades ópticas	16
1.2.2.2. GENERACIÓN DE LAS NPS.....	17
1.2.2.3. ESTABILIZACIÓN DE LAS NPS	20
• Estabilización electrostática.....	21
• Estabilización estérica.	21
1.2.2.4. CARACTERIZACION DE LAS NPS	23
• Espectroscopia de UV-Visible	23
• Dispersión dinámica de luz o DINAMIC LIGHT SCATTERING (DLS). 25	
2. ANTECEDENTES	27
3. OBJETIVOS	30
3.1. OBJETIVO GENERAL	30
4. METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	31
4.1. EQUIPOS.....	31
4.2. REACTIVOS	31
4.3. ESQUEMA EXPERIMENTAL	31
4.3.1. OBTENCIÓN DE Au-NPS POR ABLACIÓN LÁSER.....	31

•	Preparación de las muestras	32
•	Montaje y Procedimiento Experimental	32
4.3.2.	CARACTERIZACIÓN DE LAS NPS.	33
•	Espectroscopía UV-Vis.....	33
•	Dispersión Dinámica de Luz	34
4.3.3.	DETERMINACION DE MERCURIO	35
5.	RESULTADOS EXPERIMENTALES Y DISCUSIONES	38
5.1.	EFFECTO DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES SOBRE LA GENERACIÓN DE Au-NPS VÍA ABLACIÓN LÁSER	37
5.1.1.	INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DEL SURFACTANTE	37
5.1.2.	INFLUENCIA DE LA ENERGÍA DEL LÁSER	41
5.1.3.	INFLUENCIA DEL TIEMPO DE ABLACIÓN.....	46
5.1.4.	ESTABILIDAD DE LAS Au-NPS EN EL TIEMPO.....	49
5.2.	DETERMINACION DE MERCURIO	52
5.2.1.	SENSIBILIDAD DEL SISTEMA DE Au-NPS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SOLUCIONES ACUOSAS DE MERCURIO (II)	52
5.2.2.	RESPUESTA DE LAS Au-NPS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE MERCURIO (II) USANDO EL METODO DE GENERACION DE VAPOR. 54	
5.3.	EVALUACIÓN DEL SENSOR COMO MÉTODO ANALÍTICO.	57
6.	CONCLUSIONES.....	62
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	64

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Esquema del funcionamiento de un sensor químico.	7
Figura 2. Diagrama esquemático de un sensor químico combinado con un sistema de inyección de flujo. A y B son válvulas, C baño de agua termostatzado, D es un serpentín de enfriamiento, E celdas de fluorescencia.	8
Figura 3. El mercurio iónico reacciona con la tiamina para generar un encendido de la señal de fluorescencia cuando se forma el tiocromo.....	8
Figura 4. Lista parcial de estos sistemas coloidales, junto a una gama típica de tamaño.	10
Figura 5. Evolución de los estados electrónicos, desde el átomo aislado hasta el material masivo.	12
Figura 6. Variación del color de soluciones de Nps de oro con el incremento del tamaño de la partícula.....	13
Figura 7. a) Espectros de extinción para Nps de oro de diferentes radios, $r < 10\text{nm}$, (b) Espectros de extinción para Nps de oro de diferentes radios, $r > 10\text{nm}$, ambos tipos de Nps de oro están en heptano	13
Figura 8. Esquema de una Nps de oro funcionalizada con diferentes agentes a través de grupos tiol.....	14
Figura 9. Imagen de un cráter producido por la ablación láser de una superficie.	18

Figura 10. Representación de las cuatro principales etapas involucradas en la síntesis de Nps metálicas vía ablación láser.	19
Figura 11: Estructura química del dodecil sulfato de sodio (SDS).	22
Figura 12. Esquema de una micela normal, la cabeza hidrofílica es soluble en agua y la cola hidrofóbica queda fuera de la solución acuosa.	23
Figura 13. Espectro de UV-visible de nanopartículas de plata (a) y oro (b) donde se observa el desplazamiento del máximo de absorbancia en función del tamaño de la partícula.	25
Figura 14. Representaciones esquemáticas de un nanosensor de Hg (II) que operan en base de la señal de fluorescencia obtenida por la liberación de RB de una superficie de Au- Nps.....	27
Figura 15. Montaje experimental para la generación de Nps de oro por ablación láser; el segundo espejo dicroico esta colocado a 45° y la lente acromática es usada para enfocar el haz sobre la placa de oro.	32
Figura 16. Elementos del equipo empleado para la obtención de espectros de absorción UV-Vis de las Nps de oro generadas; (1) lámpara de tungsteno de Ocean Optics Inc., (2) porta muestra, (3) espectrómetro UV-Vis USB 2000 Ocean Optics Inc., (4) computadora para la adquisición de datos.	34
Figura 17. Esquema del equipo de Dispersión Dinámica de Luz empleado para la obtención de la distribución de las Nps de oro y el diámetro medio de dicha distribución.	34

- Figura 18. Programa para la adquisición de datos, distribución de Nps y sus diámetros medios e hidrodinámicos.....35
- Figura 19. Esquema del sistema para la generación de vapor de mercurio. 36
- Figura 20. (a) Distribución de Au-Nps en función del diámetro de las mismas y (b) espectros de absorbancia de Au-Nps en función de la longitud de onda. Condiciones experimentales de ablación para la generación de los complejos Au-Nps-SDS: 80,0mJ.de energía, 20 minutos de ablación y soluciones acuosas de concentración de SDS de 4,5E-2M, 4,5E-3M y 4,50E-4M.39
- Figura 21. Complejos de Au-Nps-SDS, sintetizados bajo las siguientes condiciones experimentales: 80,0mJ. de energía, 20 minutos de exposición de la placa de oro al láser y soluciones acuosas de concentración de SDS de 4,5E-2M, 4,5E-3M y 4,50E-4 M respectivamente.40
- Figura 22. (a) (c) y (e) Distribución de Au-Nps en función del diámetro de las mismas y (b), (d) y (f) espectros de absorbancia de las Au-Nps en función de la longitud de onda. Condiciones experimentales de ablación para la generación de los complejos Au-Nps-SDS: 60,0, 80,0, 100,0 y 120,0mJ respectivamente, 10, 20 y 30 minutos de exposición de la placa de oro al láser y solución acuosa de concentración de SDS de 4,5E-2M.43
- Figura 23. Complejos de Au-Nps-SDS, sintetizados bajo las siguientes condiciones experimentales: 60,0, 80,0, 100,0 y 120,0mJ de energía, 10, 20 y 30minutos de exposición de la placa de oro al láser y una solución acuosas de concentración de SDS 4,5E-2M.44

Figura 24. Complejos de Au-Nps-SDS, sintetizados bajo las siguientes condiciones experimentales: 10 20 y 30 minutos de exposición de la placa de oro al láser, 100,0 y 120,0mJ de energía y una solución acuosa de concentración de SDS $4,5E-2$ M.	47
Figura 25. (a) y (c) Distribución de Au-Nps en función del diámetro de las mismas empleando distintos tiempos de ablación; y en (b) y (d) espectros de absorbancia de Au-Nps en función de la longitud de onda. Condiciones experimentales de ablación para la generación de los complejos Au-Nps: 100,0mJ y 120,0mJ, y una solución acuosa de concentración de SDS de $4,5E-2$ M.	48
Figura 26. (a) Efecto de los procesos de agregación sobre la distribución de tamaños de las Au-Nps. (b) Efecto de los procesos de agregación sobre la forma de los espectros de las Au-Nps. Condiciones experimentales bajo las cuales se generaron las Nps de oro: 80,0mJ, concentración de SDS $4,5E-2$ M y tiempo de ablación de 30 minutos.	51
Figura 27. Espectros UV-Visible de las muestras de Au-Nps en presencia de soluciones de diferentes concentraciones de mercurio (II).	53
Figura 28. (a) dimensiones del reactor para el sistema. (b) sistema para la generación de vapor de mercurio.	55
Figura 29. Espectros UV-Visible de las muestras de Au-Nps en presencia de soluciones de diferentes concentraciones de mercurio (II) a través de un generador de vapor de mercurio.	56

Figura 30. Espectrómetro de fluorescencia atómica con vapor frío para análisis de mercurio.	58
Figura 31. Curva de calibración para el sistema de Au-Nps con generación de vapor de mercurio.	59
Figura 32. Curva de calibración para espectrómetro de fluorescencia atómica con vapor frío para análisis de mercurio.	60

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Soluciones acuosas de SDS utilizadas.	37
Tabla 2. Condiciones experimentales empleadas para la generación de Au-Nps vía ablación láser. Influencia de la concentración del estabilizante.	38
Tabla 3. Condiciones experimentales empleadas para la generación de Au-Nps, vía ablación láser. Influencia de la energía del láser.	42
Tabla 4. Condiciones experimentales empleadas para la generación de Au-Nps, vía ablación láser. Influencia del tiempo de ablación.	46
Tabla 5. Condiciones experimentales empleadas para la generación de Au-Nps, vía ablación láser. Estabilidad en el tiempo de las Au-Nps.	50
Tabla 6. Condiciones para observar la respuesta de las Au-Nps a soluciones de diferentes concentraciones de mercurio (II).	52
Tabla 7. Condiciones para observar la respuesta de las Au-Nps a diferentes concentraciones de mercurio (II). Técnica de vapor frío.	56
Tabla 8. Condiciones para observar la respuesta de la señal de las Au-Nps a diferentes concentraciones de mercurio (0). Técnica de vapor frío.	58
Tabla 9. Condiciones para realizar las medidas en el equipo de fluorescencia atómica.	59
Tabla 10. Figuras de mérito para ambos métodos.	60

LISTA DE ABREVIACIONES

Np.	Nanopartícula.
Nps.	Nanopartículas
Au-Nps.	Nanopartículas de oro
nm.	Nanómetros
ns.	Nanosegundos
UV.	Ultravioleta
RPS.	Resonancia de Plasmón Superficial
SP.	Plasmón Superficial
UV-Vis.	Ultravioleta-Visible
SDS.	Dodecil Sulfato de Sodio
CMC.	Concentración Micelar Crítica
SEM.	Microscopio Electrónico de Barrido
TEM.	Microscopía de Transmisión Electrónica
RP.	Resonancia Plasmónica
LSPR.	Resonancia de plasmón superficial localizada
DLS.	Dispersión dinámica de la luz
STM.	Microscopio de Efecto Túnel
RB.	Rodamina

INTRODUCCION

La contaminación por metales pesados tiene efectos adversos sobre el medio ambiente y también en la salud de los humanos.¹ El mercurio es un metal que posee una alta toxicidad tanto para el ser humano como para el medio ambiente. La contaminación por mercurio de los ecosistemas, se produce a través de una gran variedad de vías naturales y también de las fuentes antropogénicas, incluidas las emisiones volcánicas oceánicas, la extracción de oro, incineración de residuos sólidos y la quema de combustibles fósiles.² Este elemento se filtra fácilmente en membranas respiratorias, gastrointestinales e inclusive por la piel; los vapores de mercurio metálico y de sus derivados orgánicos (metilmercurio, por ejemplo) afectan diferentes áreas del cerebro y sus funciones asociadas, dando lugar a síntomas tales como cambio de personalidad (irritabilidad, timidez, nerviosismo), temblores, problemas de visión (constricción o estrechamiento del campo visual), sordera y pérdida de coordinación muscular, sensación y memoria.³ Además de afectar al cerebro los compuestos inorgánicos de mercurio pueden dañar el corazón, los riñones y los intestinos.⁴ Todo el mercurio que es liberado al ambiente eventualmente terminara en suelos o aguas superficiales. Las preocupaciones sobre la exposición toxica al mercurio han motivado la exploración de nuevos métodos para monitorearlo. Muchas técnicas sensibles para la detección de mercurio tales como la espectroscopia de absorción atómica, la espectroscopia de emisión, espectroscopia de masas con plasma inductivamente acoplado, (ICP-MS) espectroscopia de vapor frío y espectroscopia de fluorescencia atómica, requieren un complicado proceso para la preparación y tratamiento de la muestra y resultan costosas para laboratorios de bajo presupuesto.⁵

Una alternativa es la detección de la fluorescencia de Hg (II) empleando quimiosensores. Los quimiosensores ofrecen un enfoque prometedor sencillo y rápido para el seguimiento de mercurio en muestras biológicas, toxicológicas y medioambientales.^{6,7} Aunque algunos quimiosensores fluorescentes para Hg(II) han sido reportados, muchos de estos sistemas presentan características que limitan su uso

en la práctica, tales como una pobre solubilidad en agua, interferencia en presencia de otros iones metálicos, emisión a longitudes de onda corta, e intensidades de fluorescencia deficientes.

Por lo tanto, el desarrollo de nuevas metodologías para la detección de Hg (II) sigue siendo un reto. Un posible enfoque es el uso de las nanopartículas (Nps) que proporcionan una alta sensibilidad para la detección de iones metálicos, debido a las fuertes propiedades ópticas, de tamaño, forma y dependencia de la distancia entre partículas que estas presentan.⁸ A pesar de las variadas aplicaciones de las Au-Nps en bioanálisis de moléculas grandes, se sabe que muy pocos estudios han sido llevados a cabo para la detección altamente selectiva y sensible de iones metálicos pesados en disolución acuosa. Es por ello que el objetivo de este estudio es desarrollar un sensor de gran sensibilidad y selectividad basado en Au-Nps para la determinación de Hg (II).

1. FUNDAMENTOS TEORICOS

1.1. MERCURIO

El mercurio es un metal pesado presente en la naturaleza, este ha sido ampliamente usado desde la antigüedad para diversos fines. Actualmente se usa en la industria de la minería, siderúrgica y en la producción de gas cloro y soda caustica.⁹ Otros usos importantes incluyen el equipo eléctrico (por ejemplo, termostatos e interruptores), lámparas eléctricas, termómetros, tensiómetros y barómetros, y la amalgama dental.¹⁰ A temperatura y presión ambiental, se presenta como un líquido, brillante, denso de color blanco plateado que se evapora con facilidad pudiendo permanecer en la atmósfera hasta por un año.¹¹ El mercurio inorgánico existe en dos estados de oxidación (mercurio(I) y mercurio(II)) que se combinan con otros elementos, tales como el cloro el azufre o el oxígeno, para formar compuestos inorgánicos de mercurio o sales. Los compuestos de mercurio inorgánico como el óxido de mercurio, se utilizan en la producción de baterías y pigmentos y en la síntesis de muchas sustancias químicas orgánicas.¹²

El mercurio elemental se libera al ambiente por la incineración de combustibles fósiles (con alto contenido de carbón), la ignición de residuos sólidos, y la minería. Cuando se libera en el aire, éste lo transporta y se deposita en todas partes. Algunas actividades humanas liberan mercurio directamente al suelo o al agua, por ejemplo la aplicación de fertilizantes en la agricultura y los vertidos de aguas residuales industriales. Eventualmente todo el mercurio que es liberado al ambiente terminará en suelos o aguas superficiales¹³ de esta manera el agua puede contaminarse por la liberación directa de mercurio elemental y sus compuestos inorgánicos; en el agua el mercurio es metabolizado por los microorganismos presentes en los sedimentos acuáticos formando metilmercurio; el metilmercurio es la forma orgánica mas tóxica del mercurio, esta puede bioacumularse en las cadenas alimentarias acuáticas y terrestres. La ingestión

de mercurio de metilo, sobre todo de pescado y otros mariscos, constituye la principal fuente de exposición al mercurio de la dieta en la población general.¹⁴

- Absorción de mercurio

El mercurio elemental es absorbido principalmente por la inhalación de sus vapores y se distribuye a la mayoría de los tejidos. Después de que el mercurio elemental se absorbe, se oxida en los tejidos en sus formas inorgánicas mercuriosa y mercúrica. La concentración en la sangre de estas especies disminuye inicialmente de forma rápida, con una vida media de aproximadamente 1-3 días, seguida de un periodo más lento, de vida media de aproximadamente 1-3 semanas. Después de la exposición al mercurio elemental, la excreción de mercurio se produce fundamentalmente a través de los riñones; tanto para exposiciones agudas y crónicas, la disminución de los niveles de mercurio en la orina es progresiva con una vida media de aproximadamente 1-3 meses.

Menos del 15% de mercurio inorgánico es absorbido por el tracto gastrointestinal humano. Se produce una menor penetración de mercurio inorgánico a través de la barrera sangre-cerebro que la que se produce con el mercurio elemental o de metilo. La vida media del mercurio inorgánico en la sangre es similar a la de la fase lenta después de la inhalación de mercurio elemental. La excreción se produce por vía renal y fecal.

La fracción de metilmercurio absorbido por el tracto gastrointestinal es aproximadamente el 95%. El metilmercurio entra en el cerebro y otros tejidos donde luego se somete a desalquilación lenta al mercurio inorgánico. Los estudios farmacocinéticos en humanos indican que la disminución de metilmercurio en la sangre y en todo el cuerpo tiene una vida media de aproximadamente 50 días, la eliminación ocurre mayormente a través de las heces.

- Efectos sobre la salud

Los efectos sobre la salud del mercurio son diversos y pueden depender de la forma del mercurio a la que una persona está expuesta, la dosis y la duración de la exposición.

La exposición a altas dosis de vapor de mercurio elemental puede causar neumonía severa. En niveles inferiores causa lesión pulmonar aguda, los signos y síntomas evidentes de la inhalación crónica puede incluir temblores, gingivitis y alteraciones neurocognitivas y del comportamiento, irritabilidad, depresión, pérdida de memoria a corto plazo, fatiga, anorexia y alteraciones del sueño. La exposición ocupacional a vapores de mercurio elemental se ha asociado con efectos subclínicos de la disfunción renal.

La exposición de mercurio inorgánico por lo general se produce por ingestión. Grandes cantidades pueden causar efectos irritantes o corrosivos en el tracto gastrointestinal. Una vez absorbido, el efecto más importante se encuentra en los riñones, donde el mercurio se acumula y puede dar lugar a necrosis tubular renal. La constelación de hallazgos puede incluir anorexia, insomnio, irritabilidad, hipertensión, dolor en las extremidades, y la decoloración de las manos y los pies.

La intoxicación por metilmercurio afecta principalmente al sistema nervioso central, provocando parestesias, ataxia, disartria, discapacidad auditiva, y la constricción progresiva del campo visual, por lo general después de un período de latencia de semanas a meses. La exposición prenatal de alto nivel puede dar lugar a un gran número de los déficit de desarrollo que incluye retraso mental, ataxia cerebelosa, disartria, deformidades de los miembros, el crecimiento físico alterado, deficiencias sensoriales y parálisis cerebral. En estudios epidemiológicos recientes, los niveles más bajos de la exposición prenatal debido al consumo de pescados y mariscos materna se han asociado con un mayor riesgo de resultados anormales en pruebas neurocognitivas en los niños.¹⁵

1.2. DETERMINACION DE MERCURIO

Se ha desarrollado una amplia variedad de métodos instrumentales para la determinación del mercurio en el medio ambiente. Técnicas de análisis sofisticadas incluyen la espectrometría de absorción atómica, espectrometría de emisión atómica, espectrometría de masas con plasma inductivamente acoplado y espectrometría de fluorescencia atómica. Estos métodos proporcionan alta sensibilidad para la vigilancia de trazas de mercurio en el medio ambiente. Entre ellos, la espectrometría de absorción atómica con vapor frío, se utiliza con frecuencia para medir con precisión el mercurio en muestras ambientales y biológicas, debido a su sencillez y buena reproducibilidad.¹⁶

Aunque estos métodos proporcionar límites de detección bajos, requieren un largo y laborioso proceso de tratamiento de muestras, y a su vez, necesitan una instrumentación cara y sofisticada, lo que limita su uso como equipos portátiles. Con el fin de evitar dichos inconvenientes, se han desarrollado varios sensores que han demostrado ser instrumentos eficaces para supervisar las diferentes formas de mercurio en muestras ambientales y biológicas, en esta lista se incluyen biosensores, sensores químicos, nanosensores, y sensores piezoeléctricos.¹⁷

A continuación se discuten algunos trabajos para comprender el funcionamiento de los sensores químicos usados en la determinación de mercurio.

1.2.1. QUIMIOSENSORES

Un quimiosensor es un dispositivo capaz de transformar información química (desde la concentración de una especie hasta la composición de la muestra) en una señal analítica.

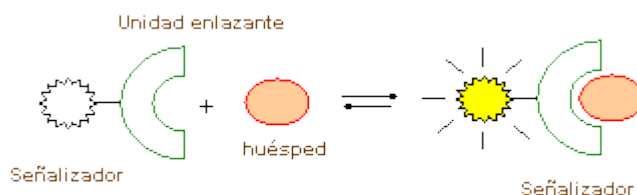


Figura 1. Esquema del funcionamiento de un sensor químico.

Los sensores químicos usualmente contienen dos componentes básicos conectados en serie (tal como se muestra en la figura 1): un sistema de reconocimiento molecular (Unidad enlazante), y un transductor físico-químico. La unidad enlazante o receptor es capaz de reconocer selectivamente un determinado analito (huésped). Fruto de este reconocimiento se produce una señal primaria de tipo eléctrico, óptico-térmico o másico. El transductor es el responsable de transformar dicha señal en otra de tipo eléctrico, la cual es más fácilmente cuantificable, medible y manipulable. La señal eléctrica producida aporta información analítica sobre la muestra, el proceso o el sistema que se está investigando.¹⁸

Los sensores químicos proveen una alta sensibilidad y bajos costos en la detección de mercurio, los más comunes se basan en la diferencia entre señales de fluorescencia.

Como ejemplo se menciona el desarrollo de un nuevo sensor químico para la determinación de mercurio iónico que se basa en la extinción de fluorescencia de una membrana de sol-gel.¹⁹ La membrana trabaja de acuerdo con un mecanismo de intercambio de iones, en el que Hg^{2+} obliga a una molécula de porfirina en una membrana de sol-gel a moverse. La unión de Hg^{2+} a la membrana produce una disminución en la señal de fluorescencia de las porfirinas, por lo tanto, el cambio en la intensidad de la fluorescencia es proporcional a la concentración de mercurio.

Otro ejemplo, lo constituye un sensor químico que combinado con un sistema de inyección de flujo continuo, es capaz de medir el mercurio iónico en el medio ambiente.

Este sensor está basado en el intercambio de un no-ion sólido soportado con tiamina.(Figura 2) ²⁰

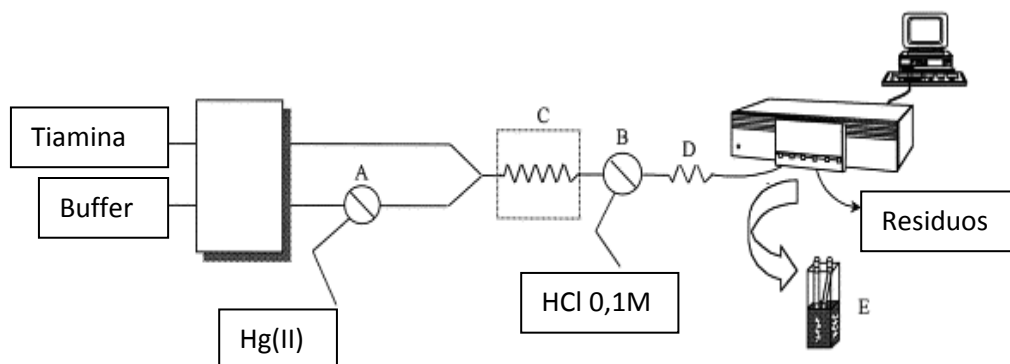


Figura 2. Diagrama esquemático de un sensor químico combinado con un sistema de inyección de flujo. A y B son válvulas, C baño de agua termostático, D es un serpentín de enfriamiento, E celdas de fluorescencia.

El principio del método fue la oxidación de la tiamina a tiocromo fluorescente. La tiamina (Vitamina B1), actúa como un marcador de "encendido" de fluorescencia específico para el mercurio iónico. El mercurio interactúa con tiamina, esta se oxida a tiocromo, y el mercurio se reduce a mercurio elemental (Figura 3). El mercurio induce una señal de fluorescencia que es que es proporcional a la concentración del mismo.

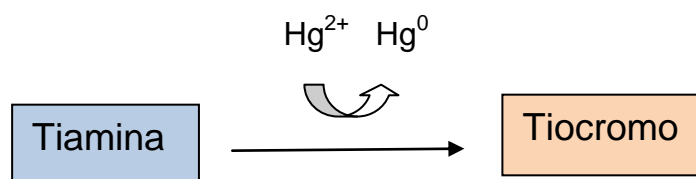


Figura 3. El mercurio iónico reacciona con la tiamina para generar un encendido de la señal de fluorescencia cuando se forma el tiocromo.

El diseño de los marcadores de fluorescencia sobre la adición de Hg^{2+} es de gran interés y en general los sensores de fluorescencia ofrecen un enfoque selectivo y sensible para la determinación y el control de mercurio en medio acuoso.

Sin embargo, la mayoría de estos sensores presentan desventajas en términos de aplicabilidad real, tales como la falta de solubilidad en agua, sensibilidad cruzada hacia otros iones metálicos, débil fluorescencia y emisión a longitudes de onda corta.²¹

Por estas razones, el reciente desarrollo de nanomateriales fotoactivos presenta un enfoque interesante y verdaderamente revolucionario para la detección selectiva, sensible y rápida de mercurio. Varios nanomateriales han sido utilizados para el control de mercurio. Las nanopartículas de oro son el principal medio de incorporación de mercurio en nanomateriales; es por ello que de ahora en adelante el trabajo se va a enfocar en los aspectos más importantes de los nanomateriales, en particular de las nanopartículas de oro.²²

1.2.2. NANOSENSORES.

La nanotecnología se refiere a las técnicas que se utilizan para manipular y controlar la materia a escala nanométrica. Es decir, controla sistemas que poseen una o más dimensiones del orden de 100nm. o menos y estudia fenómenos y propiedades de la materia a nano-escala.²³

Las partículas coloidales de tamaño nanométrico, creadas o no por la nanotecnología, cubren una gama extremadamente amplia de sistemas aparentemente diferentes. Algunos ejemplos simples y notorios son casos como el lodo, la arcilla, aerosoles, espumas, semiconductores nano-cristalinos, coloides de sílice, o de látex en el campo de la química de polímeros, virus, bacterias o células.²⁴ Sin embargo, lo que estos sistemas tienen en común son sus componentes: objetos pequeños que tienen al menos similares rangos de tamaño característicos de 1 nanómetros a 1 micrómetros. Estos objetos normalmente se conocen como nanopartículas (Nps)

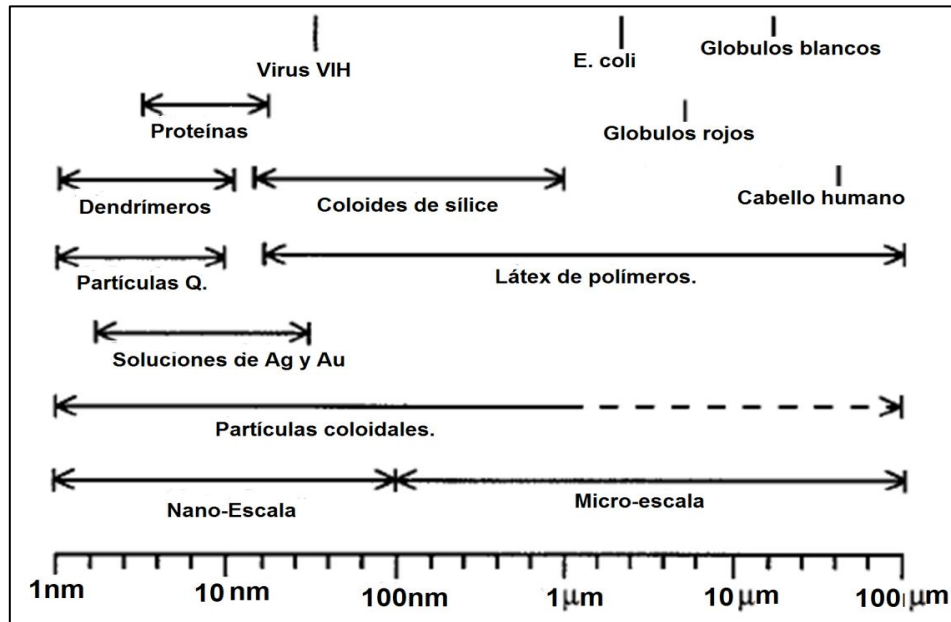


Figura 4. Lista parcial de estos sistemas coloidales, junto a una gama típica de tamaño.

Las Nps pueden ser encontradas en forma de aerosoles (sólidos o líquidos en el aire), suspensiones (sólidos en líquidos) o como emulsiones (líquidos en líquidos).

Las Nps tienen diferentes formas de interactuar unas con otras. Pueden permanecer libres o agruparse dependiendo de las fuerzas de interacción atractivas o repulsivas entre ellas. Las más comúnmente sintetizadas y estudiadas son las Nps de Au, Ag, Pt y Pd. Estas presentan propiedades tanto físicas como químicas que son diferentes a las que presenta el material en la escala de los centímetros.

Existen diferentes tipos de Nps, entre las que destaca: semiconductoras, metálicas, magnéticas, dieléctricas, etc.²⁵

Las Nps semiconductoras, conocidas como puntos cuánticos, en general, se forman de la mezcla de los elementos de la tabla periódica del grupo III con el grupo V, por ejemplo, fósforo y arsenuro de indio; o de la composición de los grupos IV y VI, como son el selenuro, telurio y sulfuro de plomo. Una propiedad interesante de las Nps semiconductoras es la fotoluminiscencia; estas son capaces de absorber luz (fotones)

para después emitirla en una longitud de onda diferente. La intensidad y el cambio en la longitud de onda de la luz irradiada sobre la partícula dan como resultado los espectros de absorción y emisión que constituyen una manifestación directa de los niveles de energía en los cuales los electrones se encuentran atrapados; las soluciones irradiadas presentan diferentes colores muy intensos, lo que las hace útiles en el marcaje y detección biológica. Así por ejemplo, las Nps de sulfuro de cadmio emiten en azul cuando es cercano a 2nm, y en naranja cuando son mayores a 5nm.

En el caso de las Nps metálicas su principal característica es que contienen un número determinado de electrones libres confinados en un espacio muy pequeño que a su vez pueden interaccionar de manera específica con la luz. Esto les da propiedades ópticas únicas tales como la resonancia plasmónica (RP). Existen otros tipos de Nps con diversos usos, como las magnéticas, empleadas en el mejoramiento de imágenes en el diagnóstico médico y las dieléctricas, las cuales han sido propuestas como modelos para su uso en la computación cuántica, porque pueden ser excitadas selectivamente por medio de pulsos ópticos.²⁶

- Nps de Oro

Las Au-Nps manifiestan interesantes características electrónicas, ópticas y químicas que dependen de su tamaño. El hecho de que las Au-Nps pueden ser de un diámetro 10.000 veces inferior al grueso de un cabello y que se puedan fabricar con un tamaño homogéneo que va desde unos pocos nanómetros hasta decenas, las coloca en una dimensión comparable a una entidad biológica como una célula (10-100 μ m), un virus (20-450nm), una proteína (5-50nm) o un gen (2nm de ancho por 10-100nm de largo).

Cuando el tamaño de las Au-Nps se encuentra en el orden de los nanómetros, entre 1 y 10nm existe una modificación en su estructura electrónica, de tal manera que se pierde la característica estructura de bandas del material masivo surgiendo niveles electrónicos discretos.²⁷ La Figura 5 muestra la evolución de los estados electrónicos,

desde el átomo aislado hasta el material masivo. Esta nueva estructura electrónica les confiere una respuesta óptica, en particular la resonancia de plasmón superficial (RPS), que varía con el tamaño. Por lo tanto, se pueden fabricar puntos cuánticos del mismo material que emiten luz en diferentes longitudes de onda dependiendo de su tamaño, por lo que son extremadamente útiles como marcadores biológicos.

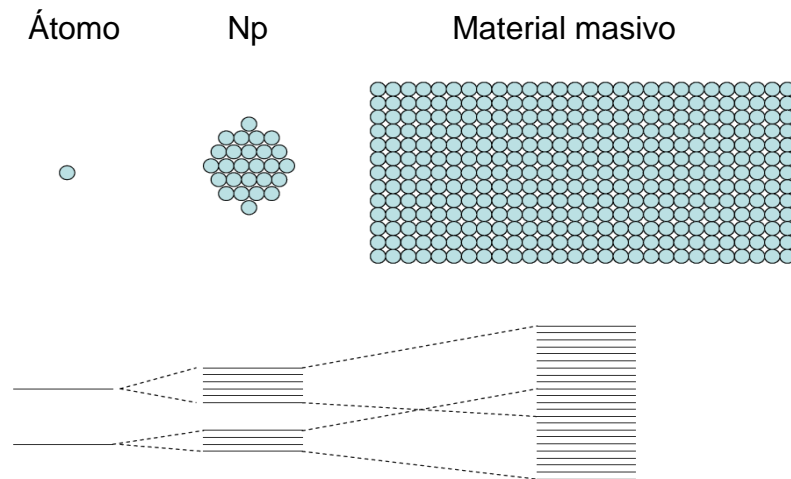


Figura 5. Evolución de los estados electrónicos, desde el átomo aislado hasta el material masivo.

Cuando las dimensiones de las partículas de oro son del orden del nanómetro, o milésima de micrómetro, el número de átomos que las constituyen es del orden de centenas. La mayoría de ellos se encuentran situados en la superficie de las Nps por lo tanto, las propiedades físicas de estas, son muy distintas de las que se observan en el sistema masivo de tamaño macroscópico de la misma composición química. Por otro lado, resulta importante destacar que en las Au-Nps, los electrones que se encuentran confinados en su superficie pueden moverse libremente. Bajo ciertas condiciones, se consigue que dichos electrones se muevan de manera más o menos ordenada y no al azar. Este movimiento colectivo (plasmón), origina que las Au-Nps en disolución presenten distintos colores según su tamaño tal como se muestra en la figura 6.

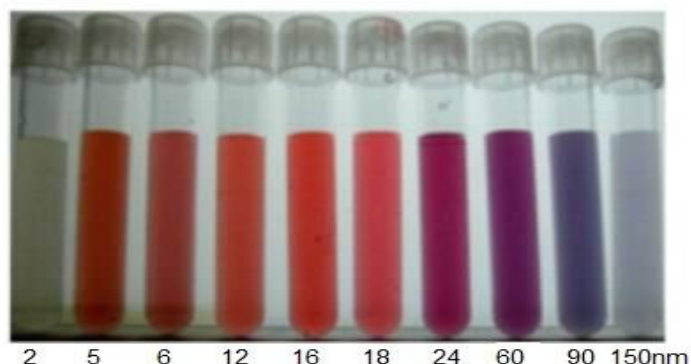


Figura 6. Variación del color de soluciones de Nps de oro con el incremento del tamaño de la partícula.

En consecuencia, estos plasmones superficiales (PS) juegan un papel importante en las propiedades ópticas de las Au-Nps. De hecho, el máximo de PS característico de Au-Nps se mantiene a 520nm. sin cambios importantes en la forma del espectro a medida que el radio de la Nps disminuye (para $r(\text{Nps}) < 10\text{nm}$) (véase Figura 7-a), sin embargo, el máximo del PS de Au-Nps se desplaza hacia longitudes de onda mayores a medida que el radio de la nanopartícula aumenta (para $r(\text{Nps}) > 10\text{nm}$) (véase Figura 7-b).

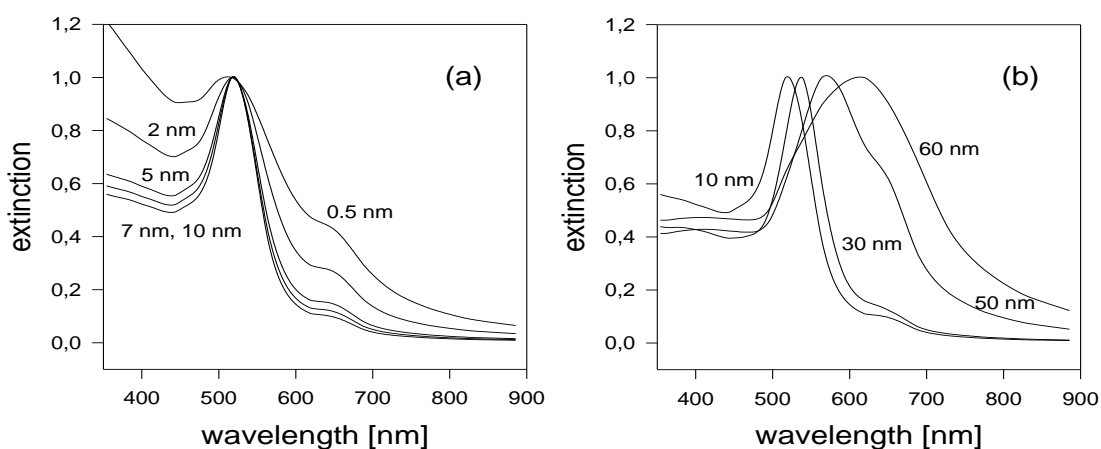


Figura 7. a) Espectros de extinción para Au-Nps de diferentes radios, $r < 10\text{nm}$, (b) Espectros de extinción para Au-Nps de diferentes radios, $r > 10\text{nm}$, ambos tipos de Au-Nps están en heptano.

Otra característica de las Au-Nps, es que reaccionan instantáneamente con el medio que les rodea. Presenta una gran capacidad de funcionalización con agentes químicos o biológicos a través de los fuertes enlaces que forma con el grupo tiol.²⁸ (véase Figura 8).

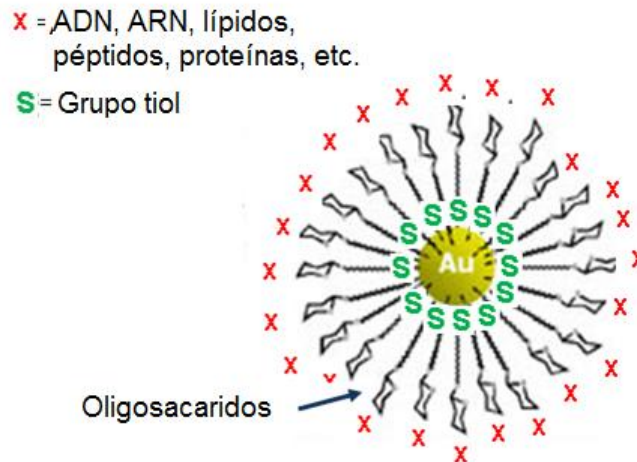


Figura 8. Esquema de una Au-Nps funcionalizada con diferentes agentes a través de grupos tiol.

Esta funcionalización es usada en la mayoría de los casos para tratar de realzar o reforzar las propiedades ópticas características de las Au-Nps. De hecho, existe una relación entre la intensidad del enlace proveniente de moléculas protectoras (surfactantes), agentes funcionalizadores, etc., con la superficie de las Au-Nps y las propiedades ópticas, electrónicas y magnéticas de esas Nps recubiertas. Esta funcionalización obviamente afecta la banda de plasmón superficial (PS) de las Au-Nps en el espectro UV-Vis. En el caso específico de aplicaciones en el campo de la biomedicina, la funcionalización de Au-Nps tiene como objetivo lograr Nps capaces de fijarse selectivamente en las células afectadas de cáncer, para posteriormente calentarlas hasta destruir tumores malignos.

1.2.2.1. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LAS NPS

El origen de las propiedades físicas que presentan las Nps, es doble: (i) la reducción en tamaño, que produce cambios en los niveles electrónicos de las Nps y (ii) el incremento de los átomos de superficie respecto a los de volumen. Las propiedades físicas de las Nps difieren substancialmente del material masivo de partida de donde se les forma. Dichas Nps están conformadas por diez, cientos y miles de átomos de metal. Venta G. J., reportó una marcada dependencia para la relación del número de átomos de superficie con respecto a los de volumen con el tamaño de Nps de oro. En particular, por debajo de 15nm los átomos de superficie superan el 10% del total y su fracción aumenta rápidamente a medida que se sigue reduciendo el tamaño. De La Venta G. J.²⁹ llegó a la conclusión que para estos tamaños tan pequeños, los átomos de superficie adquieren una gran importancia e incluso llegan a gobernar las propiedades físicas del sistema. Así mismo, las propiedades magnéticas, térmicas, ópticas, eléctricas, químicas y mecánicas tienen una dependencia directa con el tamaño de las Nps y, por tanto, se ven afectadas seriamente por este parámetro.

Las nanopartículas tienen a menudo singulares propiedades físicas y químicas. Por ejemplo las propiedades electrónicas, ópticas y químicas de las nanopartículas pueden diferir en gran medida a las del conjunto macro.

Se pueden observar propiedades dependientes del tamaño, como por ejemplo, el confinamiento cuántico en partículas semiconductoras, resonancia de plasmón de superficie en algunas partículas metálicas y superparamagnetismo en materiales magnéticos.

A menudo las Nps tienen propiedades visibles inesperadas porque son lo suficientemente pequeñas como para confinar sus electrones y producir efectos cuánticos.³⁰

- Propiedades ópticas

Es evidente que la luz desempeña una función importante en nuestras vidas, por ello ha sido estudiada durante siglos. Sin embargo, no han dejado de aparecer fenómenos relacionados con la luz que dan lugar a nuevos campos de investigación, por ejemplo la plasmónica, la cual estudia las propiedades ópticas de Nps metálicas. Las Nps metálicas, además de reflejar la luz, contienen un número determinado de electrones libres confinados en un espacio muy pequeño, lo que les confiere propiedades ópticas como la resonancia de plasmón superficial (RPS).³¹

El fenómeno de RPS se manifiesta cuando un haz de luz incide sobre Nps de oro, produciéndose una oscilación colectiva de electrones, lo que se traduce a su vez en la emisión de luz por parte de las Nps en una determinada zona del espectro UV-Vis.³² El color de esa luz emitida depende del tamaño, forma y propiedades de dichas Nps. Esta propiedad óptica se puede ver claramente en el caso específico del oro, donde soluciones de distintos tamaños de Nps presentan colores que van desde el púrpura hasta el marrón. La Figura 6 muestra la variación del color de las Nps de oro en solución en función del incremento en el tamaño de la partícula.

Cualquier superficie metálica; plana, esférica, cilíndrica o de cualquier otra forma, posee PS. En partículas metálicas, la longitud de onda a la que existen estos plasmones localizados depende del tipo de metal, del tamaño de la partícula y de la forma de esta. Para esas longitudes de onda, el campo electromagnético se localiza alrededor de la superficie del metal. Cuando luz con longitud de onda igual a la de los plasmones localizados incide sobre la partícula metálica, se produce un efecto resonante, que lleva asociado un aumento enorme de la intensidad del campo electromagnético en las proximidades de la partícula.

La RPS es muy sensible a cambios en la superficie del metal, en particular a cambios en la función dieléctrica del medio, por lo que se puede usar para la detección de

moléculas adsorbidas en la superficie. Aparecen así algunas de las aplicaciones, como son los chips de análisis de ADN y los dispositivos identificadores de proteínas.³³

1.2.2.2. GENERACIÓN DE LAS NPS

Actualmente existe una amplia variedad de métodos para obtención de Nps. Los métodos de fabricación de Nps metálicas pueden clasificarse como químicos o físicos. Entre los métodos químicos destacan: desplazamientos de ligandos en complejos organometálicos, reducción de ácido úrico con borohidruro de sodio para la generación de Nps de oro, reducción de metales de transición por vía electroquímica y fotoquímica, etc. Entre los estudios más relevantes para la generación de Au-Nps usando métodos químicos, se encuentra el de Brust et al.³⁴ el cual generó mediante síntesis química, Au-Nps protegidas por dodecanotiol, método que permitió obtener de forma relativamente sencilla Nps con tamaños bien definidos. Otro ejemplo de métodos químicos que permite la fabricación de Nps metálicas, específicamente de Pd, es la reacción redox, utilizando $R_4N^+X^-$ como surfactante en tetrahidrofurano. Como precursor del Pd se usa $Pd(NO_3)_2$ en un exceso de acetato tetrabutilamonio, el nitrato es desplazado por ligandos de acetato que es más efectivo, lo que es seguido por la reducción del Pd^{+2} que mediante transferencia de electrones genera conjuntos de Nps estabilizadas de Pd^0 .

La molienda de partículas micrométricas, la nanolitografía o la pulverización catódica, evaporación térmica, y la ablación láser constituyen ejemplos de los métodos físicos más usados.³⁵ En particular, la ablación láser se ha convertido en el método físico más utilizado para generar Au-Nps y de otros metales como Ag, Pd, Fe, Cu, etc., en soluciones tanto acuosas como orgánicas. En efecto, existen numerosos estudios para la fabricación de Au-Nps mediante la ablación láser. Chen Y. y Yeh C.³⁶ usaron la ablación láser para sintetizar Nps de plata con la ayuda de surfactantes; dodecil sulfato de sodio (SDS) y bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), hallando que pequeñas y estables Nps, por mucho más tiempo, eran obtenidas en soluciones de SDS. Así

mismo, Mafuné F. et al.,³⁷ produjo Au-Nps vía ablación láser a partir de láminas de oro en solución acuosa de SDS, encontrando que el tamaño de las Nps disminuían con el incremento de surfactante. Previamente, Mafuné F. et al., en otro trabajo de investigación, preparó Au-Nps con una amplia distribución de tamaños vía ablación láser de placas de oro en solución acuosa de SDS, encontrando que para ganar una notable reducción de tamaño y obtener estables Nps era necesario una concentración de SDS por encima de la concentración micelar crítica (CMC).

- Ablación Láser

La ablación láser es un procedimiento que se usa para extraer el material de la superficie de un sólido mediante la irradiación de esta con un rayo láser pulsado (ver Figura 9). El proceso se lleva a cabo controlando la duración de los pulsos láser, que pueden variar entre unos milisegundos y unos femtosegundos, o controlando la energía o irradiancia a la cual se trabaja.³⁸ Este control tan preciso hace que la técnica sea muy valiosa a nivel de investigación e industrial.



Figura 9. Imagen de un cráter producido por la ablación láser de una superficie.

El proceso de la ablación láser se puede explicar a través de cuatro principales fases: (i) vaporización (ii) nucleación (iii) formación de aglomerados y (iv) obtención final de Nps³⁹ (véase Fig.10)

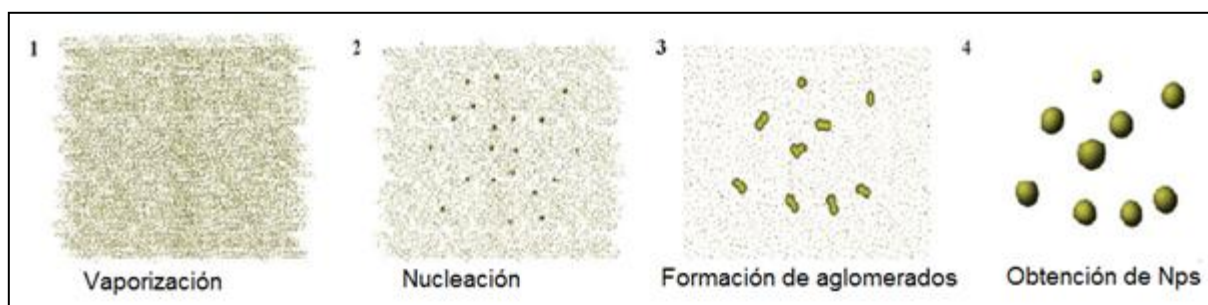


Figura 10. Representación de las cuatro principales etapas involucradas en la síntesis de Nps metálicas vía ablación láser

En la etapa 1, denominada vaporización, la energía del láser se transforma en calor, haciendo que se incremente la temperatura de la placa, provocando que una parte de este material se funda y luego se evapore. Luego en la etapa 2, llamada nucleación, el material es convertido en un plasma donde existen combinaciones de diferentes especies de liquido-metal las cuales presentan distinta temperatura, presión y composición. Adicionalmente, en la etapa 2 o “nucleación”, se forma una densa nube de átomos alrededor de la zona de ablación, siendo las interacciones entre dichos átomos tan fuertes por lo que de forma casi inmediata, comienzan a agregarse para formar Nps embrionarias. Enseguida, en la etapa 3, conocida como formación de aglomerados o “clusters”, las Nps embrionarias experimentan procesos de aglomeración para formar Nps de mayor tamaño, presentándose dos tipos de tipos de interacciones que compiten entre sí; las interacciones interpartícula Nps-Nps y las interacciones de las Au-Nps con el medio ambiente que rodea la partícula, ambos tipos de interacciones determinaran el diámetro final de la partícula. Finalmente, una vez culminada la etapa 3, ocurre la última etapa, es decir, la obtención final de Au-Nps.

El fenómeno de la ablación láser es influenciado por la longitud de onda del láser usado. A mayor longitud de onda, mayor será la velocidad de ablación y menor el fraccionamiento. Cuando la energía es relativamente baja, la superficie del material se calienta al absorber la energía de los fotones del rayo y sublima, o se evapora. Por el contrario, cuando la irradiancia es muy intensa, usualmente, el material se transforma en un plasma.⁴⁰ Durante el proceso de la ablación láser, se puede controlar la cantidad de energía absorbida y, de este modo, la cantidad de material que se puede extraer del material masivo por la aplicación de un simple pulso.

Entre las principales características de la ablación láser destacan: (i) las Nps que se obtienen pueden tener una distribución de tamaño dispersos y desiguales, una consecuencia derivada de la tendencia que tienen las partículas a aglomerarse una vez que el láser incide sobre ellas,⁴¹ de hecho, Chen Y. y Yeh C., demostraron claramente que la interacción entre el láser pulsado y las Nps metálicas conduce a una severa agregación de las partículas y amplia distribución de tamaños,⁴² (ii) las propiedades físicas de los nanomateriales obtenidos dependen del tamaño de las partículas que los integran,⁴³ (iii) es una herramienta poderosa usada para cambiar el tamaño y la estructura geométrica de Au-Nps, aprovechando el hecho de que las Au-Nps tienen un intenso pico característico de PS centrado a 520nm, y (iv) el láser pulsado no requiere modificar la atmósfera en la que se va a desarrollar el trabajo y no genera desechos, por lo que el proceso es muy barato, a juzgar por las cantidades de material masivo que se necesita para generar las Nps.

1.2.2.3. ESTABILIZACIÓN DE LAS NPS

Con el uso de los métodos de generación de nanopartículas que se disponen en la actualidad surgen problemas a la hora de querer controlar ciertos parámetros físicos como lo son la distribución de tamaños de las nanopartículas generadas y su estructura morfológica. Esto es debido en gran parte a la tendencia que tienen las nanopartículas

a agregarse unas con otras para formar estructuras de mayor tamaño y más estabilidad. Es por esto que es necesario el uso de reactivos que permitan minimizar estos efectos de aglomeración para realmente poder obtener nanopartículas estables en el tiempo.

Existen fundamentalmente dos formas de estabilizar las nanopartículas, estas son: Por interacción electrostática y por impedimento estérico.⁴⁴

- Estabilización electrostática

Este tipo de estabilización se basa en las fuerzas de repulsión debidas al principio de exclusión de Pauli. El principio de la estabilización electrostática es el de la adsorción de iones sobre la superficie electrofílica del metal con el fin de generar una distribución de partículas cargadas positiva y negativamente denominada doble capa, ésta doble capa eléctrica origina fuerzas de repulsión coulombicas entre las partículas individuales. Si el potencial eléctrico asociado con la doble capa es el adecuado, la repulsión electrostática generada evita la aglomeración de las nanopartículas.⁴⁵ Por ejemplo este efecto es observado cuando se generan Au-Nps usando HAuCl_4 y citrato de sodio con calentamiento, el citrato reduce el oro (III) y genera las partículas coloidales en solución, luego una capa de iones citratos presentes en la solución son absorbidas en la superficie de las nanopartículas generando una doble capa, esto hace que al acercarse una partícula con otra se generen fuerzas de repulsión coulombicas que las mantienen separadas unas de otras.

- Estabilización estérica.

Los métodos de síntesis de Nps, tanto físicos como químicos, originan dos problemas físicos que deben ser controlados: (i) la distribución de tamaño y estructura de las Nps generadas y (ii) procesos de aglomeración que tienden a experimentar las Nps. Por lo general, las Nps sufren agregación, proceso en el cual unas Nps se unen con otras para formar estructuras de distinto tamaño y estabilidad. Para minimizar esa tendencia

de agregación, es fundamental emplear reactivos que permitan obtener Nps mucho más estables en el tiempo.

La estabilización estérica de Nps usa surfactantes para evitar la agregación de las Nps. Los agentes surfactantes (agentes activo de superficie),⁴⁶ son compuestos anfifílicos de naturaleza orgánica que poseen una parte hidrofílica (sus “cabezas” polares), las cuales permanecen en la fase acuosa y otra parte hidrofóbica (sus “colas” no polares), las cuales interaccionan con la parte oleosa no soluble en agua, ver figura 11

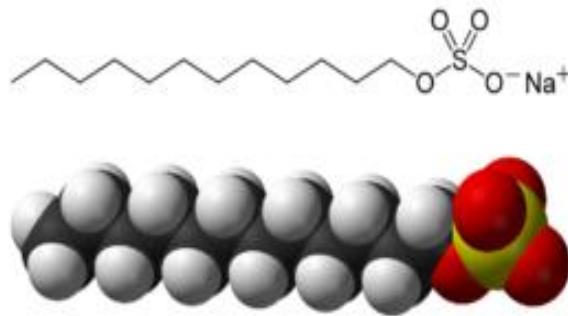


Figura 11: Estructura química del dodecil sulfato de sodio (SDS).

Muchos surfactantes pueden reunirse en el seno de la disolución en forma de agregados “micelas” tal como se puede observar en la Figura 12. La dimensión y tamaño de las micelas formadas dependen de la estructura del surfactante y del ambiente físico-químico. En principio, dependiendo del tipo de disolvente, los surfactantes pueden formar micelas normales e inversas. La concentración en la que los tensoactivos empiezan a formar micelas es conocida como la concentración micelar crítica (CMC).⁴⁷

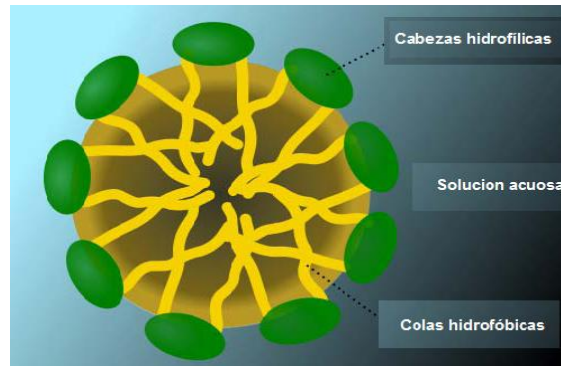


Figura 12. Esquema de una micela normal, la cabeza hidrofílica es soluble en agua y la cola hidrofóbica queda fuera de la solución acuosa.

Los agentes tensoactivos pueden ser iónicos; (i) catiónicos, con carga positiva sobre la parte más voluminosa de su estructura, (ii) aniónicos, con carga negativa sobre esta última, (iii) anfóteros, que se comportan como catiónicos a valores de pH ácidos o aniónicos en la zona alcalina o (iv) no iónicos, usualmente se presentan en solución como iones no disociados, es decir, en partículas no cargadas eléctricamente.

1.2.2.4. CARACTERIZACION DE LAS NPS

La caracterización de las Nps de oro puede llevarse a cabo mediante diversas técnicas, entre las que destacan: la espectroscopía UV-Vis, microscopía electrónica, dispersión dinámica de luz, microscopio de fuerza atómica (AFM), microscopio de efecto túnel (STM), entre otras.⁴⁸

- Espectroscopia de UV-Visible

Para comprender el porqué del uso de la espectroscopia de UV-visible para la caracterización de nanopartículas metálicas es necesario entender primero los fenómenos sensibles a ésta técnica que están presentes en el sistema de nanopartículas.

Los plasmones superficiales son fluctuaciones en la densidad electrónica en la frontera de dos materiales, o un material y el medio que lo rodea. Los plasmones son las vibraciones colectivas de un gas de electrones (o plasma) que rodean la estructura reticular de un metal. Cuando los plasmones se unen con un fotón, la partícula generada es llamada polaritón. Este polaritón se propaga a lo largo de la superficie del metal, paralelamente a la interfase metal/dieléctrico, hasta que éste decae, ya sea por absorción, donde la energía es convertida en fonones, o por una transición radiativa a un fotón.

La excitación de los plasmones superficiales con luz es llamada resonancia de plasmón superficial (SPR), para el caso de superficies planares, o resonancia de plasmón superficial localizada (LSPR), para el caso de estructuras metálicas nanométricas.

Éste fenómeno es la base de muchas herramientas estándar utilizadas para medir la absorción de material en las superficies metálicas planares (generalmente oro y plata) o en la superficie de nanopartículas metálicas.⁴⁹

El componente del campo eléctrico de la luz incidente interactúa con la densidad electrónica de cada partícula metálica, causando que la densidad electrónica colectiva comience a oscilar a una frecuencia que es resonante con la frecuencia de la luz incidente. La longitud de onda de absorción de la LSPR es sensible al tamaño, composición y forma de las nanopartículas, así como también de su orientación, espaciado y del ambiente dieléctrico.

Para el caso de las nanopartículas, las oscilaciones del plasmón superficial localizado son las responsables de los intensos colores observados en las soluciones de nanopartículas con resonancia de plasmón y también de la gran dispersión que presentan. Las nanopartículas de metales nobles muestran fuertes bandas de absorción en el visible que no están presentes en los espectros de sus equivalentes macro ni en los de los átomos individuales.⁵⁰

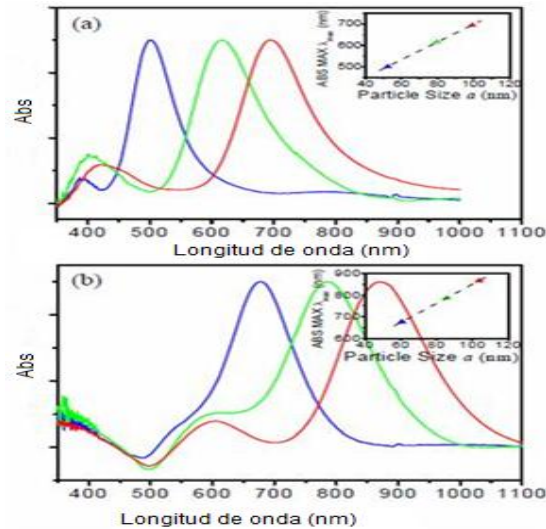


Figura 13. Espectro de UV-visible de nanopartículas de plata (a) y oro (b) donde se observa el desplazamiento del máximo de absorción en función del tamaño de la partícula.

Otra técnica muy apropiada para la caracterización de las Nps de oro es la dispersión dinámica de luz (DLS)

- Dispersión dinámica de luz o DYNAMIC LIGHT SCATTERING (DLS).

Una de las técnicas empleadas para determinar el tamaño de partículas es la Dispersión Dinámica de Luz, la cual también es conocida como Espectroscopia de Correlación de Fotones. Al incidir un haz de luz monocromático, como un Láser por ejemplo, sobre una solución la cual contiene partículas que siguen un movimiento browniano, se produce un cambio en la dirección del haz incidente, esto ocurre gracias a la fluctuación de la constante dieléctrica en la solución, la cual provoca un cambio en el campo eléctrico del haz.

La dispersión del haz incidente se da en todas las direcciones, un detector es colocado a un ángulo θ respecto al haz incidente. Éste detector, que generalmente se trata de un fotomultiplicador, recibe la radiación que sale dispersada a dicho ángulo de la solución y

transforma esa radiación captada en una señal eléctrica. Esta señal eléctrica es llevada a un sistema de colección de datos (computador). El computador mediante una función de autocorrelación, relaciona la fluctuación del campo eléctrico con la fluctuación de la constante dieléctrica de la solución, esta medida se realiza en tiempo real por lo que se obtiene un rango amplio de intensidades dependientes del tiempo.

Las fluctuaciones de la constante dieléctrica son fluctuaciones no periódicas o aleatorias, una gráfica de esta propiedad fluctuante en función del tiempo, decae de forma exponencial. El tiempo relacionado a dicha relajación, se conoce como tiempo de decaimiento, y está relacionado con el Coeficiente de Difusión D de la solución y a su vez este coeficiente está relacionado mediante la ecuación de Stoke-Einstein con el tamaño de la partícula.⁵¹

Por su parte, el microscopio electrónico usa electrones para iluminar la muestra y crear una imagen ampliada de la misma, la interacción del haz de electrones con la muestra permite obtener información sobre su morfología, composición y estructura.⁵² La que más comúnmente se requiere para cualquier estudio es la microscopía de transmisión electrónica (TEM) y la de alta resolución. Estas técnicas permiten (i) el estudio del tamaño de las Nps y de su dispersión y (ii) la estructura y morfología de los átomos que se aglomeran formando la Nps.

2. ANTECEDENTES

- En el año 2006; **Chih-Ching H. y Huan-Tsung C.**, desarrollaron un sensor basado en nanopartículas de oro (Au-Nps) para la determinación de Hg (II) en soluciones acuosas. Las moléculas de rodamina B presentan un decaimiento en la señal de fluorescencia cuando se adsorben sobre la superficie de Au-Nps. En presencia de iones metálicos, tales como Hg (II), las moléculas de RB se liberan de la superficie Au-Nps y restablecen de esta manera su señal de fluorescencia. Ellos mejoraron la selectividad del sensor aún más mediante la modificación de las superficies de Au-Nps con ligandos tioles (ácido mercaptopropiónico, ácido mercaptosuccínico y homocisteína) y la adición de un ligando quelante (Ácido 2,6-piridinedicarboxílico) tal como se muestra en la figura 12. Bajo las condiciones óptimas, la selectividad de este sistema hacia Hg (II) frente a otros iones metálicos en disolución acuosa resulta ser muy alta (50 veces o más), y el Límite de detección para el Hg (II) en la matriz: agua del estanque fue de 2,0 ppb.⁵³

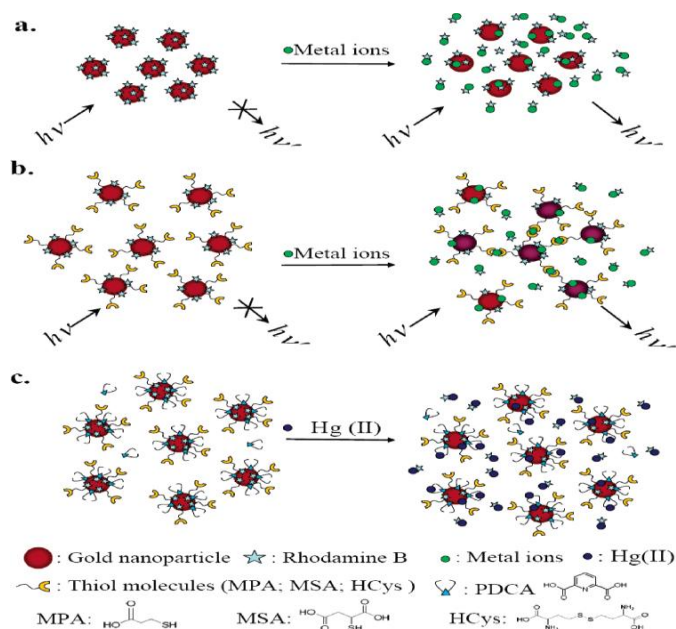


Figura 14. Representaciones esquemáticas de un nanosensor de Hg (II) que operan en base de la señal de fluorescencia obtenida por la liberación de RB de una superficie de Au- Nps

- En el año 2007 **Darbha, G.K.; Ray, A.; Ray, C.P.** Utilizaron un sensor basado en nanopartículas de oro (Au-Nps) para la determinación de Hg (II) en muestras de suelo, agua y peces. Detectaron niveles de mercurio en dichas muestras, con una excelente sensibilidad (2 ppt) y selectividad para Hg (II) con respecto a otros iones. Los mejores resultados se obtuvieron para las muestras de agua, aunque los resultados para las muestras de suelo y peces están 2 o 3 ordenes por encima de los valores límites establecidos por EPA. ⁵⁴
- En el 2007 **Chen J, Zheng A, Chen A, Gao Y, He C, Kai X, Wu G, Chen Y.** utilizaron un sensor basado en nanopartículas de oro (Au-Nps) para la determinación de Hg (II) en muestras ambientales de agua. Generaron Au-Nps vía química y las modificaron con ácido tioglicólico y un tinte fluorescente (Rodamina 6G). El trabajo se basa en la medida del decaimiento de la fluorescencia que presentan las moléculas de Rodamina 6G cuando se adsorben sobre la superficie de las Au-Nps. El rango de concentraciones obtenidos para Hg(II) va de 5×10^{-10} a $3,5 \times 10^{-8}$ M con un límite de detección de $6,0 \times 10^{-11}$ M. ⁵⁵
- En el año 2008 **Wang H., Wang Y., Jin J., Yang R.** realizaron un sensor basado en nanopartículas de oro (Au-Nps) para la determinación de Hg (II) en soluciones acuosas. Generaron las Au-Nps vía química, y para la determinación de Hg(II) usaron tanto un método colorimétrico (cambio de color) así como también la medida de la extinción de la fluorescencia de un tinte. Funcionalizaron las Au-Nps con un tinte fluorescente y con una tiamina de cadena simple de ADN. Los cambios observados son: que cuando la solución cambia de azul-gris a rojo, se registra un decaimiento de la fluorescencia; en presencia de Hg(II) la solución se torna azul-gris y el valor de

fluorescencia se restablece. El sistema de determinación de Hg(II) exhibe un rango de $9,6 \times 10^{-8}$ a $6,4 \times 10^{-6}$ M con un límite de detección de $4,0 \times 10^{-8}$ M. ⁵⁶

- En el año 2009, **M. A. Ortega; L. Echevarría; J. Castillo y A. Fernández** desarrollaron un sensor de mercurio basado en nanopartículas coloidales de oro. El sensor de mercurio está basado en la inhibición de fluorescencia que ejercen nanopartículas (Nps) coloidales de oro sobre la Rodamina560. Las Nps coloidales fueron generadas por la Ablación Láser de una placa de oro. En esta solución se aplicó un flujo de Hg^0 , producto de la reducción de soluciones acuosas de Hg^{2+} , empleando como agente reductor NaBH_4 (Método de Vapor Frío). Se observó un incremento en la emisión de fluorescencia de la solución NPS-Rodamina en presencia del Hg^0 . Estos resultados pueden ser atribuidos a que el Hg^0 amalgama la partícula, rompiendo de esta manera su asociación con el colorante, liberándolo y presentando nuevamente su emisión radiativa característica. Por lo anteriormente expuesto, es posible detectar la presencia de Hg^0 en solución, mediante la determinación de la variación de la señal de fluorescencia. El desarrollo de esta técnica ofrece una nueva oportunidad para la detección del mercurio en soluciones acuosas a niveles de ppb. ⁵⁷
- En el año 2010 **Wang Y., Yang F., Yang X.** realizaron un ensayo para la determinación de Hg(II) en presencia de plomo (II) usando nanopartículas de oro modificadas. generaron Au-Nps vía química, y las modificaron con una molécula biológica (TBA) que consiste en seis unidades de timidina y nueve unidades de guanosina. Estudiaron muestras en donde estaban presentes diferentes cationes, y para mitigar la interferencia de plomo(II) tomaron la medida de absorbancia a 800nm. En donde se facilita la medida de Hg(II) en presencia de plomo(II). La curva de calibración evaluada a 800 nm. para el Hg(II) presenta un rango de concentración de 0,39 a 8,89 μM con un límite de detección de 200 nM. Este método da resultados satisfactorios para la determinación de Hg(II) en muestras de agua. ⁵⁸

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

- Desarrollar un prototipo de sensor basado en nanopartículas de oro (Au-Nps) para la determinación de mercurio.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar Au-Nps en solución acuosa vía ablación láser.
- Caracterizar las Au-Nps empleando métodos espectroscópicos.
- Estudiar el efecto de diferentes concentraciones de mercurio sobre las propiedades ópticas de las soluciones de Au-Nps.
- Evaluar un método para la determinación de mercurio empleando Au-Nps.

4. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

4.1. EQUIPOS.

Para generar las Au-Nps se usa un láser Nd:YAG, aluminio dopado con neodimio y granate de itrio; Nd: Y3Al5O12 modelo Continuum Surelite, con pulsos de 8 ns de duración, frecuencia de 10 Hz, de longitud de onda variable: fundamental ($\lambda=1064$ nm.), segundo armónico ($\lambda= 532$ nm.), y tercer armónico ($\lambda=355$ nm.). Para medir la energía del láser se usa un medidor de energía. Coherent J50, modelo FieldMax II Top, y para caracterizar las Au-Nps se usa tanto un espectrómetro UV-Vis Ocean Optics Inc., modelo LS-I, como un equipo de Dispersión Dinámica de Luz.

4.2. REACTIVOS

Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) 95,0%, Placa de oro 99%, cloruro de mercurio (HgCl), borohidruro de sodio (NaBH₄), ácido clorhídrico (HCl), ácido nítrico (HNO₃), cloruro de estaño (SnCl₂) y como solventes agua destilada y etanol absoluto 99,8%

4.3. ESQUEMA EXPERIMENTAL

La parte experimental de este trabajo consta de tres etapas a saber: Generación de las Au-Nps, caracterización de las Au-Nps y determinación del mercurio (II) en soluciones acuosas. A continuación, se discutirán cada uno de ellas.

4.3.1. OBTENCIÓN DE Au-NPS POR ABLACIÓN LÁSER.

La ablación láser se ha utilizado para la obtención de nanopartículas de metales tales como Pt, Pd, Ag y Au. Diversos estudios demuestran la versatilidad de la ablación láser entre ellos el trabajo de Mafuné F. et al, ellos prepararon Au-Nps con una amplia distribución de tamaños, vía ablación láser de placas de oro en solución acuosa de SDS.⁵⁹ En este sentido, se propone seguir su metodología para obtener las Au-Nps en el laboratorio.

- Preparación de las muestras

Las Au-Nps deben ser generadas en un medio que evite su posterior aglomeración; es por ello que para la estabilización de las Au-Nps generadas, se emplea Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) como tensoactivo. Se prepara una solución de concentración de $4,5 \times 10^{-2} \text{M}$. Los viales y todo el material de vidrio, se lavan con etanol y se secan apropiadamente. Antes de añadir la solución de SDS en el vial, es necesario filtrarla, para ello se emplea un filtro millipore de $0,45 \mu\text{m}$. y una jeringa que se ajuste al mismo. También la placa de oro se lava con etanol y se deja secar antes de colocarla en el vial. En un vial limpio y seco, se coloca una placa pequeña de oro acompañada de $4,5 \text{mL}$. de la solución acuosa de SDS previamente filtrada.⁶⁰

- Montaje y Procedimiento Experimental

Una vez que los viales están preparados se procede a la generación de las Au-Nps en solución acuosa de SDS, empleando la técnica de la ablación láser, siguiendo el montaje experimental de la figura 15.

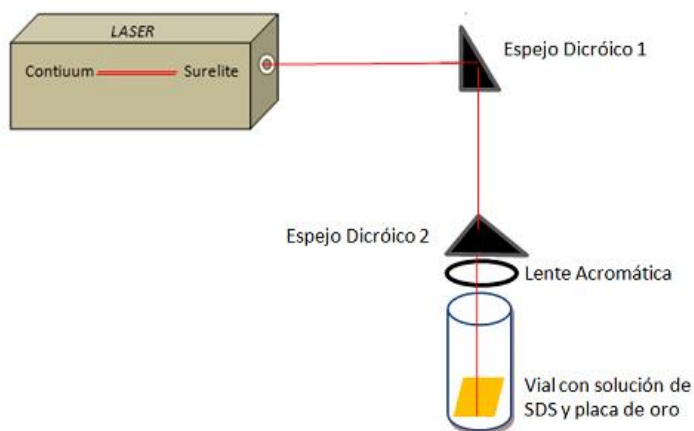


Figura 15. Montaje experimental para la generación de Au-Nps por ablación láser; el segundo espejo dicróico está colocado a 45° y la lente acromática es usada para enfocar el haz sobre la placa de oro.

Antes de comenzar el proceso de ablación, siempre es importante determinar la energía del haz sobre la superficie de la placa de oro. Para ello, una vez estabilizado el láser por espacio de 15 minutos, se mide la energía del haz usando un medidor de energía (Coherent J50, modelo FieldMax II Top)

Una vez determinada la energía, se coloca el vial con la lámina de oro en la zona donde se encuentra enfocado el haz y se realiza la ablación por el tiempo requerido. A medida que el láser incide sobre la placa de oro, la solución se colorea, lo que indica la presencia de Au-Nps en el medio.

4.3.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS NPS.

Una vez que se obtienen las condiciones para generar las Au-Nps., el siguiente paso es caracterizarlas, es decir, se debe buscar información en cuanto al tamaño y la distribución de las Au-Nps obtenidas. Para ello se usan dos técnicas: Espectroscopía UV-Vis y dispersión dinámica de la luz.

- Espectroscopía UV-Vis

Se utiliza la espectroscopia UV-Vis con el fin de obtener los espectros correspondientes a las Au-Nps generadas y de esta manera obtener información sobre el máximo de absorbancia, desplazamientos en la longitud de onda y la forma de los espectros.

Esto se lleva a cabo, empleando el Espectrofotómetro de UV-Vis Ocean Optics, modelo LS-I y el programa utilizado para la adquisición de datos es el OOI Base32, v2.0.1.4 tal como se muestra en la figura 16.

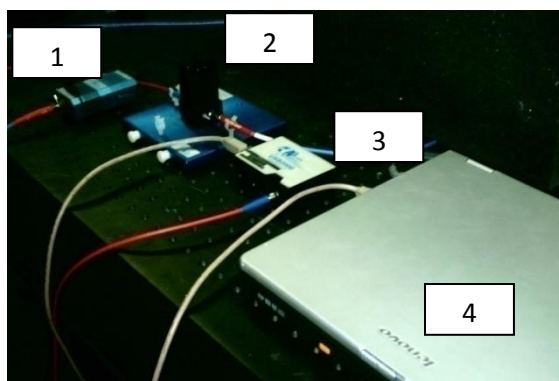


Figura 16: Elementos del equipo empleado para la obtención de espectros de absorción UV-Vis de las Nps de oro generadas; (1) lámpara de tungsteno de Ocean Optics Inc., (2) porta muestra, (3) espectrómetro UV-Vis USB 2000 Ocean Optics Inc., (4) computadora para la adquisición de datos.

- Dispersión Dinámica de Luz

La dispersión dinámica de la luz se utiliza para obtener datos acerca de la distribución de las Au-Nps y el diámetro promedio de dicha distribución. En la figura 17 se observa el esquema del equipo de Dispersión Dinámica de Luz diseñado en el Laboratorio de Espectroscopía Láser de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela.

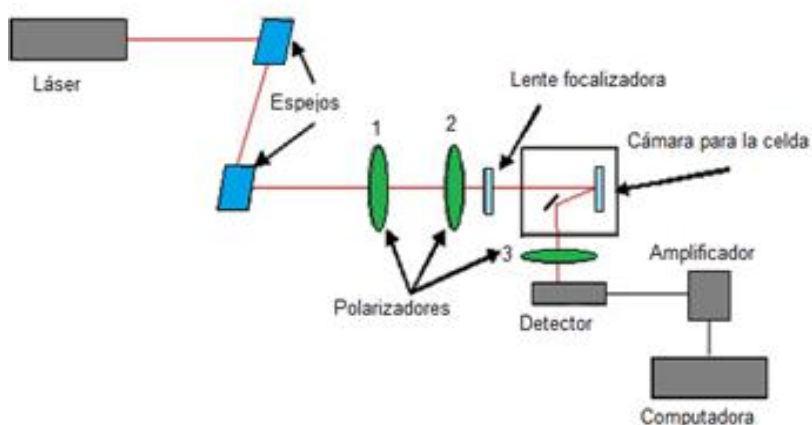


Figura 17: Esquema del equipo de Dispersión Dinámica de Luz empleado para la obtención de la distribución de las Nps de oro y el diámetro medio de dicha distribución.

Para realizar la medición, se enciende primeramente el láser, se coloca la celda que contiene la muestra de Au-Nps en el porta muestra, se verifica que el equipo este alineado, se ajusta el ángulo al que se desea medir y se tapa herméticamente de tal manera que no entre luz interferente al equipo de DLS. Se abre el programa de adquisición de datos dls.cumulante.vi (Figura 18), se enciende el detector (TFM) y se aumenta el voltaje.

Seguidamente, se coloca las condiciones en las que se realiza la medida (ángulo, temperatura, índice de refracción del medio, viscosidad, longitud de onda del láser empleado, tiempo máximo, número de medidas, etc.). Una vez establecidas las condiciones, se adquiere la medida y se guarda el archivo de datos con la distribución de tamaños y el diámetro promedio

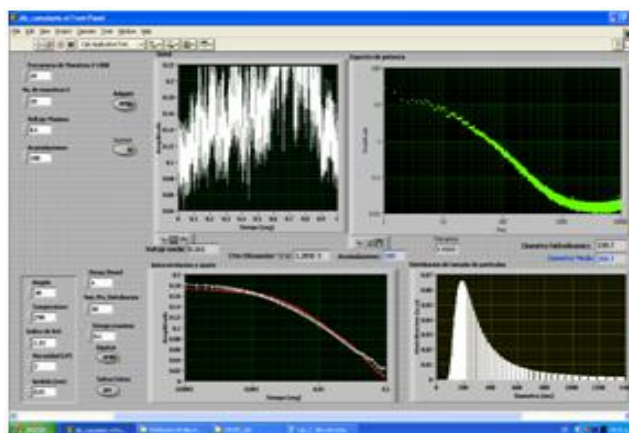


Figura 18: Programa para la adquisición de datos, distribución de Nps y sus diámetros medios e hidrodinámicos.

4.3.3. DETERMINACION DE MERCURIO

Una vez caracterizadas las Au-Nps, se procede a elaborar un prototipo de sensor para determinar Hg. Para ello las Au-Nps obtenidas y caracterizadas se ponen en contacto con soluciones de distintas concentraciones de mercurio (II) esto se hace inicialmente de manera directa y luego a través del diseño de un reactor sencillo para generar

hidruros, el generador de hidruros usa como agente reductor el Borohidruro de sodio. Luego de burbujear el vapor de mercurio producido, se toma el espectro UV-Visible de las soluciones resultantes, en la figura 19 se muestra un esquema para este experimento.

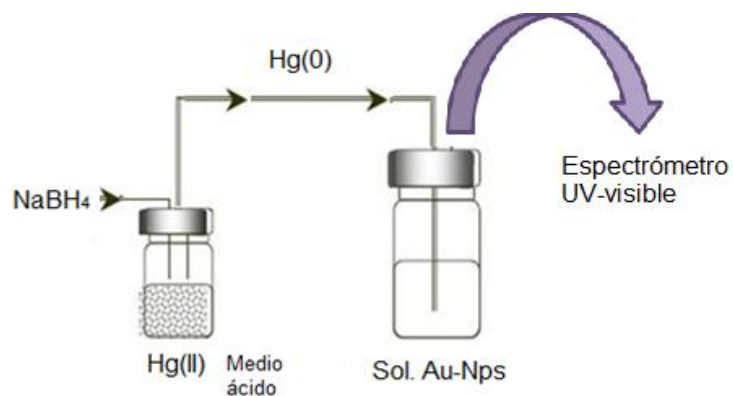


Figura 19. Esquema del sistema para la generación de vapor de mercurio.

Una vez diseñado el prototipo de sensor, se evalúa su potencial analítico mediante el cálculo de las figuras de mérito tales como límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ), el rango dinámico lineal o el límite de linealidad (LOL) y estos valores son comparados con los obtenidos por la técnica de fluorescencia atómica con vapor frío.

5. RESULTADOS EXPERIMENTALES Y DISCUSIONES

5.1. EFECTO DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES SOBRE LA GENERACIÓN DE Au-NPS VÍA ABLACIÓN LÁSER

En primer lugar, se realizó un estudio para determinar el alcance e influencia de ciertas condiciones o variables experimentales de la ablación láser, sobre los espectros de absorción, la distribución de tamaños y las propiedades ópticas de las Au-Nps generadas. Las variables experimentales que se modificaron son: concentración del surfactante [SDS], energía del láser y tiempo de ablación. Se trabajó a la longitud de onda fundamental (532 nm) y a una frecuencia fija de 10 Hz.

5.1.1. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DEL SURFACTANTE

Se utilizó el surfactante aniónico dodecil sulfato de sodio (SDS) para la estabilización de las Au-Nps generadas por ablación láser. El SDS proporciona una estabilización estérica, a través de la cual permite tener control sobre la distribución de tamaños y estructura de las Au-Nps generadas evitando, a su vez, los procesos de aglomeración que tienden a experimentar las mismas. Se preparó una solución de SDS de concentración 4,5E-2M, y a partir de esta se realizaron las diluciones de 4,5E-3M y 4,5E-4M para así estudiar la influencia de estas concentraciones en la síntesis de las Au-Nps. En la Tabla 1, se pueden apreciar las concentraciones de SDS que se emplearon para la síntesis de Au-Nps por ablación láser.

Tabla 1. Soluciones acuosas de SDS utilizadas

[SDS] (mol/L)	Dilución realizada (mL.)	Volumen final (mL.)
(4,5+/-0,2)E-2	-	500,00
(4,5+/-0,2)E-3	10 en 100	100,00
(4,50+/-0,02)E-4	1 en 100	"

Una vez preparadas las soluciones acuosas de SDS, se llevó a cabo la síntesis de Au-Nps vía ablación láser siguiendo el procedimiento mencionado en la parte experimental. Se ensayó, por duplicado con cada concentración, a un tiempo de ablación de 20 minutos y a una energía fija de 80,0mJ. La Tabla 2, muestra el rango de concentraciones de SDS que se emplearon, las condiciones de generación de cada grupo de Au-Nps y los diámetros promedios obtenidos.

Tabla 2. Condiciones experimentales empleadas para la generación de Au-Nps vía ablación láser. Influencia de la concentración del estabilizante.

Muestra	[SDS] (mol/L)	Energía +/-0,1(mJ.)	T. de ablación. +/-1(min.)	Max. de abs. +/-0,01(nm.)	Diámetro prom. +/-0,01(nm.)
1	(4,5+/-0,2)E-2	80,0	20	493,25	23,20
2	(4,5+/-0,2)E-3	“	“	496,74	32,80
3	(4,50+/-0,02)E-4	“	“	500,92	47,20

En la Figura 20 se puede observar en (a) la variación de la distribución de las Nps con el diámetro de las mismas; medidas con una apreciación de +/-0,01nm. y en (b) el espectro UV-Vis de las Au-Nps generadas, medido con una apreciación de +/-0,01nm. Estos complejos Au-Nps-SDS fueron generados por duplicado, bajo las siguientes condiciones experimentales: (i) energía del láser de 80,0mJ, (ii) tiempo de ablación de 20 minutos y (iii) se emplearon tres diferentes concentraciones de SDS: 4,5E-2M, 4,5E-3M y 4,50E-4M.

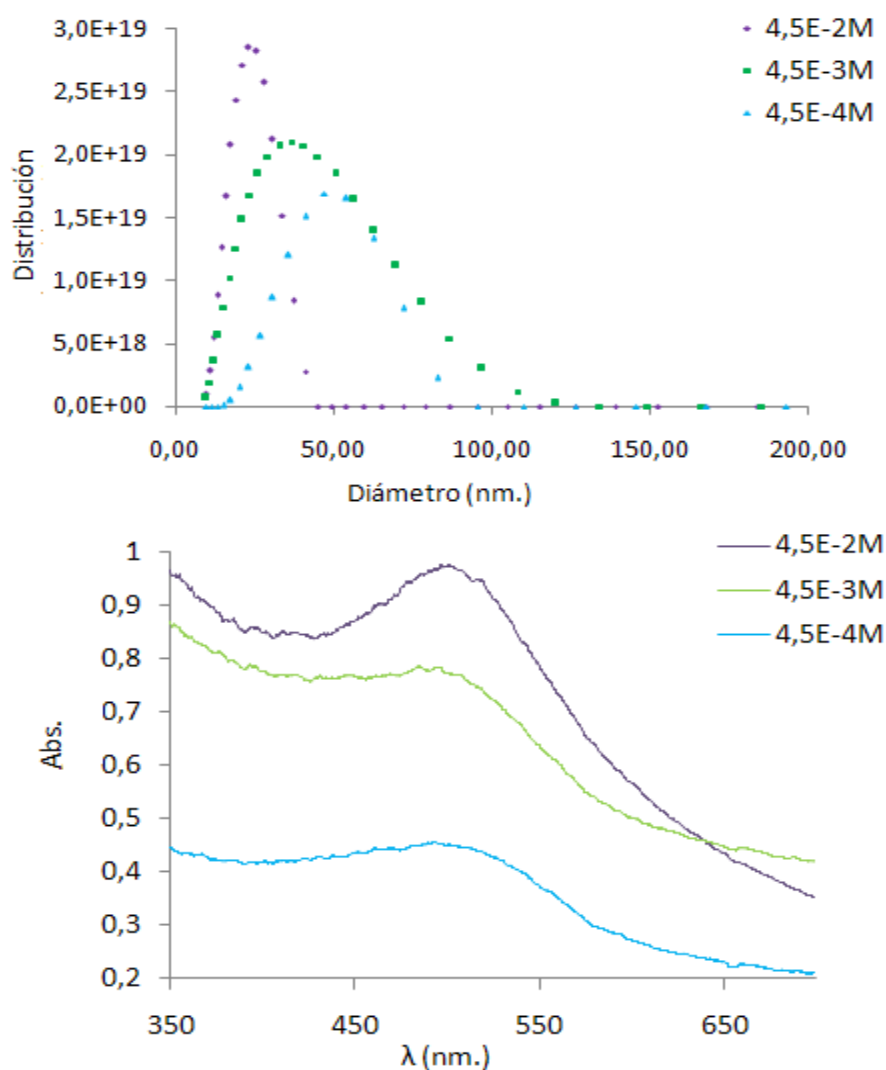


Figura 20. (a) Distribución de Au-Nps en función del diámetro de las mismas y (b) espectros de absorbancia de Au-Nps en función de la longitud de onda. Condiciones experimentales de ablación para la generación de los complejos Au-Nps-SDS: 80,0mJ.de energía, 20 minutos de ablación y soluciones acuosas de concentración de SDS de 4,5E-2M, 4,5E-3M y 4,50E-4M.

En la figura 20-(a) se aprecia, que cuando se usan concentraciones de surfactante de 4,5E-4M, las moléculas de SDS resultan ineficientes para proteger a las Au-Nps. Y por lo tanto, se obtienen partículas de mayor tamaño. Por el contrario, con concentraciones elevadas de surfactante (4,5E-2M) las moléculas de SDS protegen mejor y más

efectivamente a las Au-Nps generadas, esta concentración permite preparar selectivamente Au-Nps con diámetros medios de 20,00nm. con respecto a aquellas Au-Nps sintetizadas en soluciones acuosas de concentración $4,5E-3M$ y $4,5E-4M$ de SDS, cuyos diámetros medios e hidrodinámicos fueron de 32,80nm y 47,20nm respectivamente. La Figura 21 muestra la fotografía de los complejos Au-Nps-SDS generados.

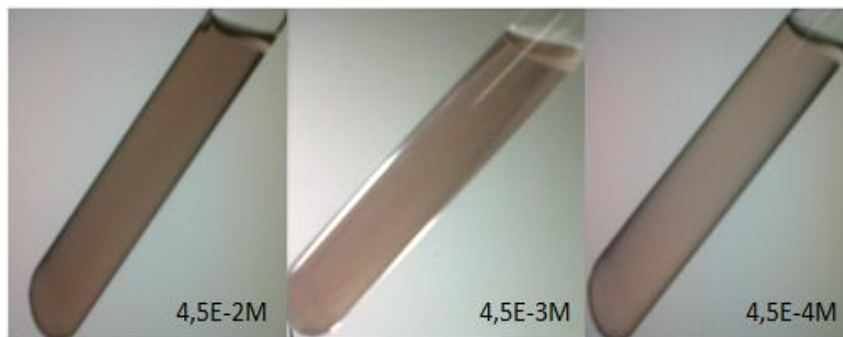


Figura 21. Complejos de Au-Nps-SDS, sintetizados bajo las siguientes condiciones experimentales: 80,0mJ. de energía, 20 minutos de exposición de la placa de oro al láser y soluciones acuosas de concentración de SDS de $4,5E-2M$, $4,5E-3M$ y $4,5E-4M$ respectivamente.

En la literatura se reporta que Yamada K., et al.⁶¹ encontraron que los procesos de agregación de las Au-Nps se favorecían cuando la concentración de SDS disminuía hasta llegar a ser muy diluidas, mientras que las soluciones concentradas de SDS promovían la obtención de Au-Nps mucho más esféricas y de diámetro medio reducido.

En los espectros de absorbancia de la figura 20-(b) se notan tres hechos relevantes: (i) un ínfimo desplazamiento de la banda de plasmón superficial (PS), que indica la variación del diámetro promedio de partículas (ii) incrementos en el pico de máxima absorción, que pone de manifiesto la cantidad de Au-Nps generadas en el medio; por Ley de Beer, se sabe que la absorción es directamente proporcional a la cantidad de analito capaz de absorber radiación, y (iii) a medida que se incrementa la concentración

del estabilizante, el pico de máxima absorbancia de las Au-Nps también aumenta, a su vez se observa que la mayor cantidad de Au-Nps se obtuvo usando concentraciones altas del estabilizante ($4,5E-2M$). Este comportamiento se debe a la reducción de tamaño progresivo de las Nps inducido por aumentos en la concentración del estabilizante. A medida que las Au-Nps disminuyen de tamaño son capaces de absorber más energía. Esta tendencia se observó en los espectros obtenidos en la figura 20-(b), Adicionalmente, al observar el espectro obtenido para las muestras de Au-Nps sintetizadas en una solución acuosa de concentración de SDS de $4,5E-4M$, se ve que tiene un máximo de absorción considerablemente menos intenso que el resto de las muestras generadas al mismo tiempo de ablación (20 minutos). Esto evidencia que en esta muestra el solvente fue capaz de solvatar prácticamente todas las moléculas de SDS, permitiendo la libre agregación de las Au-Nps en coloides de un tamaño mucho mayor.

5.1.2. INFLUENCIA DE LA ENERGÍA DEL LÁSER

En base a los resultados presentados, se decidió trabajar, con una concentración de SDS de $4,5E-2M$ para la generación de las Au-Nps; también se utilizó un rango de energías entre 60,0 y 120,0mJ. Esto con el fin de lograr: (i) la mayor cantidad de Au-Nps, (ii) menor diámetro medio de partícula posible y (iii) evitar las agregaciones que se puedan producir con una concentración cercana o menor a la CMC del SDS. Después de haber decidido la concentración de SDS a emplear, se procedió a estudiar el efecto de la energía tanto sobre la distribución de tamaños de las Au-Nps generadas así como también sobre sus espectros de absorbancia, para ello se prepararon los complejos Au-Nps-SDS que se muestran en la Tabla 3

Tabla 3. Condiciones experimentales empleadas para la generación de Au-Nps, vía ablación láser. Influencia de la energía del láser.

Muestra	[SDS] +/-0,2E-2(mol/L)	Energía +/-0,1(mJ.)	T. de ablación. +/-1 (min.)	Max. de abs. +/-0,01(nm.)	Diámetro prom. +/-0,01(nm.)
4	4,5E-2	60,0	10	495,35	47,20
5	“	80,0	“	498,83	37,20
6	“	100,0	“	485,56	12,52
7	“	120,0	“	498,83	23,20
8	“	60,0	20	496,74	49,40
9	“	80,0	“	492,20	45,50
10	“	100,0	“	491,16	13,20
11	“	120,0	“	500,92	43,00
12	“	60,0	30	504,40	62,60
13	“	80,0	“	498,83	47,00
14	“	100,0	“	501,97	23,20
15	“	120,0	“	505,06	47,70

En la Figura 22 podemos notar en (a), (c) y (e) la variación de la distribución de las Au-Nps con el diámetro de las mismas con una apreciación de +/-0,01nm. y (b), (d) y (f) el espectro de absorbancia de las Au-Nps medido con una apreciación +/-0,01nm. Los complejos de Au-Nps son generados por duplicado, bajo las siguientes condiciones experimentales: (i) cuatro diferentes energías del láser de 60,0, 80,0, 100,0 y 120,0 mJ, respectivamente, (ii) tiempo de ablación de 10, 20 y 30 minutos y (iii) una solución acuosa de concentración de SDS de 4,5E-2M.

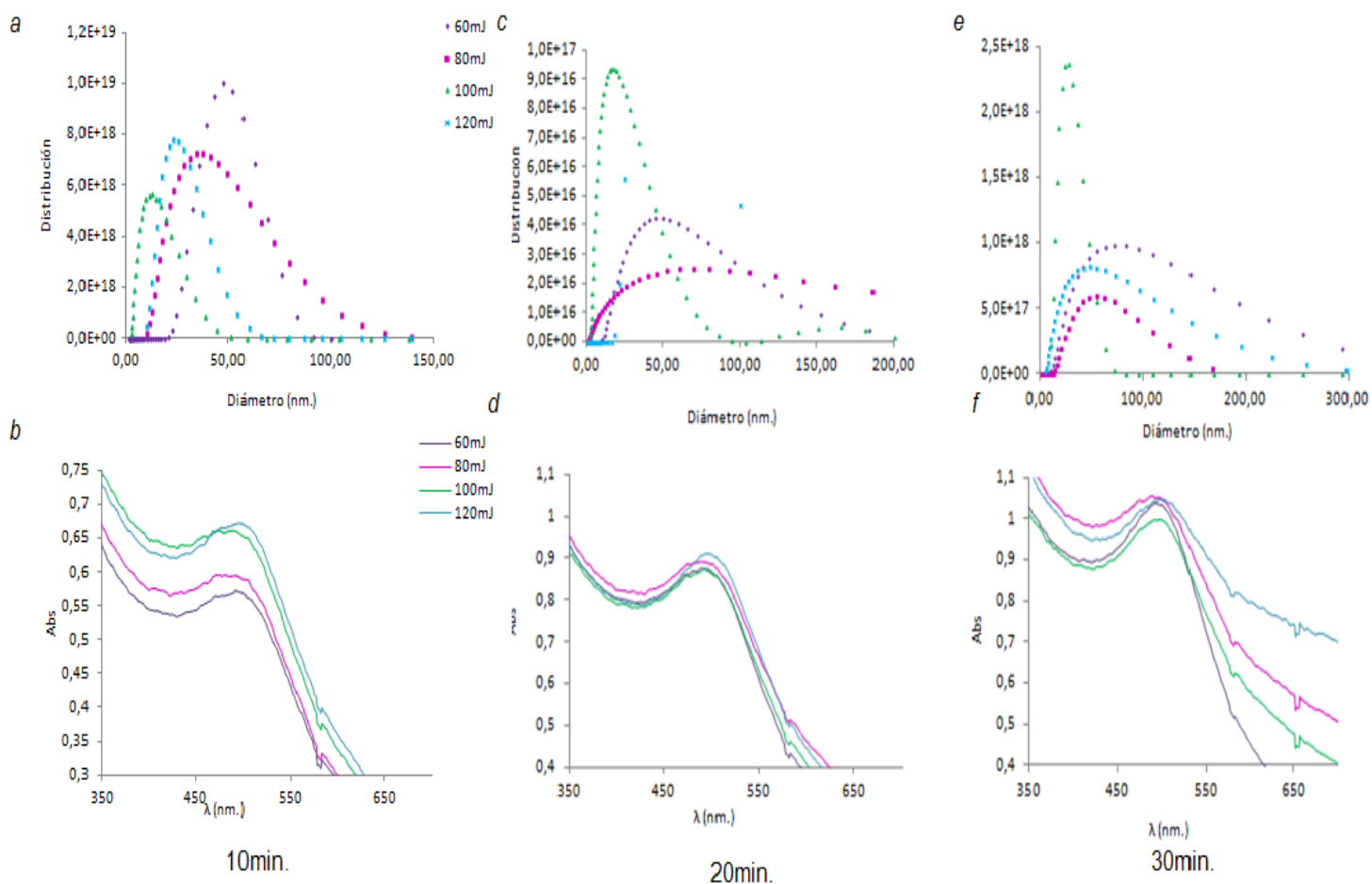


Figura 22. (a) (c) y (e) Distribución de Au-Nps en función del diámetro de las mismas y (b), (d) y (f) espectros de absorbancia de las Au-Nps en función de la longitud de onda. Condiciones experimentales de ablación para la generación de los complejos Au-Nps-SDS: 60,0, 80,0, 100,0 y 120,0mJ respectivamente, 10, 20 y 30 minutos de exposición de la placa de oro al láser y solución acuosa de concentración de SDS de $4,5E-2M$.

En la figura 22-(a) y 22-(c) se aprecia que a medida que se incrementa la energía sobre la placa de oro se generan nanopartículas de menor diámetro, es decir, el diámetro medio de la partícula decae progresivamente con el aumento de la energía del láser; mientras que en la figura 22-(e) se observa una distribución de tamaño mayor, obteniéndose a su vez Au-Nps de diámetro medio mayor. Por otro lado, en la figura 22-(b), 22-(d) y 22-(f) se puede observar que a medida que se incrementa la energía, el

pico de máxima absorción de las Au-Nps de también aumenta. En la literatura se reportan resultados espectrales similares a los que se hallaron, adjudicándolos al fenómeno conocido como la “reducción de tamaño progresivo”; a medida que las nanopartículas disminuyen de tamaño son capaces de absorber más energía debido al aumento en su brecha de banda.

La figura 23 muestra la fotografía los complejos Au-Nps-SDS sintetizadas bajo las condiciones experimentales descritas anteriormente.

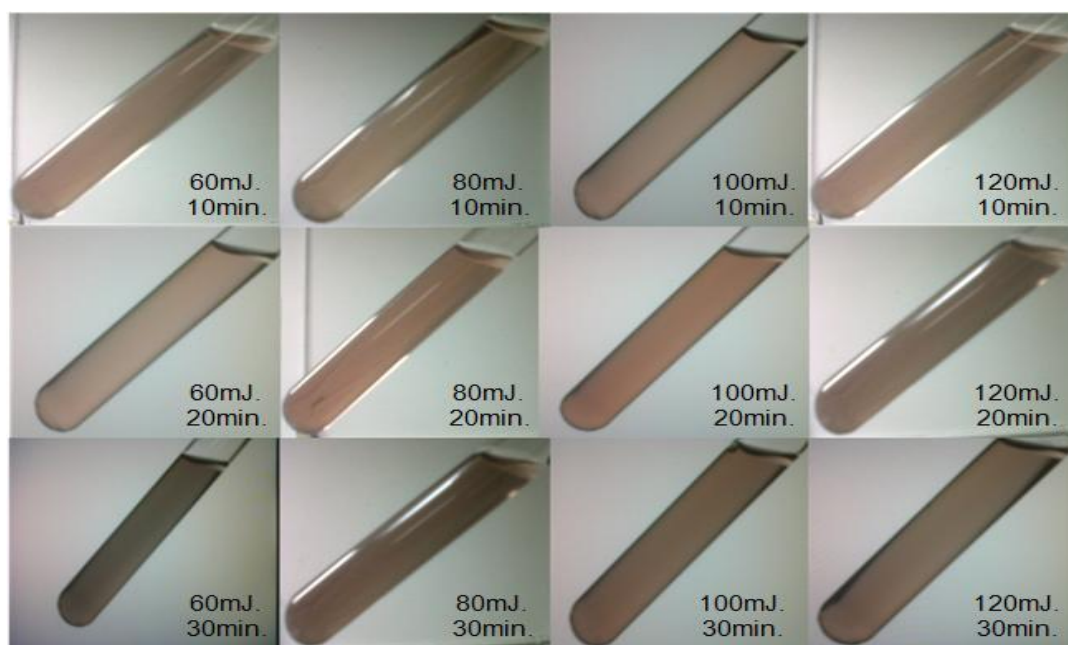


Figura 23. Complejos de Au-Nps-SDS, sintetizados bajo las siguientes condiciones experimentales: 60,0, 80,0, 100,0 y 120,0mJ de energía, 10, 20 y 30minutos de exposición de la placa de oro al láser y una solución acuosa de concentración de SDS $4,5E-2M$.

El resultado observado en las partes (a), (c) y (e) de la figura 22 se debe al refraccionamiento o fenómeno de fraccionamiento inducido por láser de las Au-Nps de diámetro promedio mayor, las cuales se encuentran ya formadas y presentes en el medio y que están siendo nuevamente irradiadas. Mafuné F., et al. en el año 2001, llegaron a un resultado similar; ellos observaron que el tamaño de la partícula disminuía

a medida que se incrementaba la fluencia del láser; atribuyendo estos resultados al fenómeno de fragmentación inducido por láser. Así mismo, Mafuné F., et al., reportaron que el diámetro de las Au-Nps se reduce drásticamente cuando se emplean altas fluencias del láser, llamando a este fenómeno como proceso de reducción de tamaño. Mafuné F., et al. Llegaron a la conclusión que cuando el PS de las Au-Nps en una solución de SDS es excitado por la irradiación del láser, la energía del fotón es rápidamente transformada en modos internos de la Nps como calor, durante un pulso, la nanopartícula absorbe muchos fotones, aumentando su temperatura y posteriormente fragmentándose. Después de un pulso del láser, el calor se difunde dentro de la solución y la temperatura de la Nps regresa a temperatura ambiente antes de que el siguiente pulso incida. El calentamiento y enfriamiento ocurre entre pulso y pulso, resultando la velocidad de fragmentación incrementada con el aumento de la fluencia del láser debido principalmente al incremento de la energía interna de la nanopartícula irradiada.

Igualmente, Takami A., et al.⁶³ describieron dicho fenómeno para Au-Nps irradiadas con láser. Cuando el láser irradia una Au-Nps el PS de esta comienza a absorber fotones y los electrones son excitados, producto de la absorción. Una vez absorbidos, gran parte de la energía de estos fotones es convertida rápidamente en calor, lo que genera un incremento significativo en la temperatura de la Nps. La reducción de tamaño se origina debido a la vaporización de la partícula de oro, cuando la temperatura de la solución coloidal de las Nps alcanza el punto de ebullición, átomos y pequeñas partículas son eyectados a través de la vaporización y como resultado las partículas son reducidas de tamaño. La cantidad de átomos eyectados depende de la energía del láser.

5.1.3. INFLUENCIA DEL TIEMPO DE ABLACIÓN

Para esta parte de la investigación, se estudió como el tiempo de ablación influye sobre las características espectrales UV-Vis de las Au-Nps generadas. Los resultados obtenidos, sugieren que el uso de una concentración de 4,5E-2M de SDS y un elevado valor de energía se traducen en una mayor cantidad de Au-Nps generadas con menor diámetro medio. Por lo tanto, para este estudio se sintetizaron muestras de Au-Nps con altos valores de energía manteniéndose la concentración del estabilizante en 4,5E-2M y modificándose el tiempo de exposición de la placa de oro al láser (véase Tabla 4).

Tabla 4. Condiciones experimentales empleadas para la generación de Au-Nps, vía ablación láser. Influencia del tiempo de ablación.

Muestra	[SDS] +/-0,2E-2(mol/L)	Energía +/-0,1(mJ.)	T. de ablación. +/-1 (min.)	Max. de abs. +/-0,01(nm.)	Diámetro prom. +/-0,01(nm.)
16	4,5E-2	100,0	10	485,60	12,52
17	"	"	20	491,20	13,12
18	"	"	30	501,90	23,20
19	"	120,0	10	498,80	23,20
20	"	"	20	500,90	43,00
21	"	"	30	505,10	47,70

Una vez que se inicia la ablación sobre la placa de oro y el tiempo de exposición transcurre, se observa que la solución cambia de incolora a diferentes tonalidades rosado-morado, lo que indica la presencia de Nps en el medio, como se muestra en la figura 24.

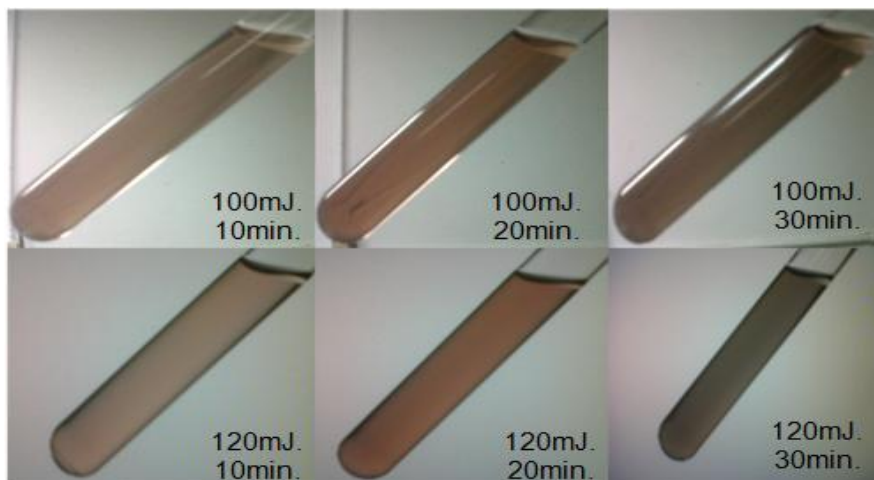


Figura 24. Complejos de Au-Nps-SDS, sintetizados bajo las siguientes condiciones experimentales: 10, 20 y 30 minutos de exposición de la placa de oro al láser, 100,0 y 120,0mJ de energía y una solución acuosa de concentración de SDS $4,5E-2$ M.

En la Figura 24 se observan soluciones de Au-Nps de diferentes intensidades de color. Según el tiempo de exposición, la tonalidad de la solución coloidal de Au-Nps-SDS varía de manera significativa, se pueden apreciar soluciones de tonalidad más intensa indicando una mayor cantidad de partículas y por lo tanto presentando espectros de absorción más intensos (véase (b) y (d) en la figura 25).

Los cambios de color de incoloro a rosado o a púrpura indican desplazamientos en la longitud de onda del máximo de absorción debido a diferencias entre los diámetros promedio de partícula entre cada muestra.

La Figura 25 muestra en (a) y en (c) la distribución de las Au-Nps en función del diámetro de las mismas con una apreciación de $\pm 0,01$ nm. y en (b) y (d) el espectro UV-Vis. de las Au-Nps. Las muestras fueron generadas por duplicado, bajo las siguientes condiciones experimentales: (i) energía del láser de 100,0mJ y 120,0mJ, (ii) tiempo de ablación de 10, 20 y 30 minutos y (iii) una solución acuosa de concentración de SDS $4,5E-2$ M.

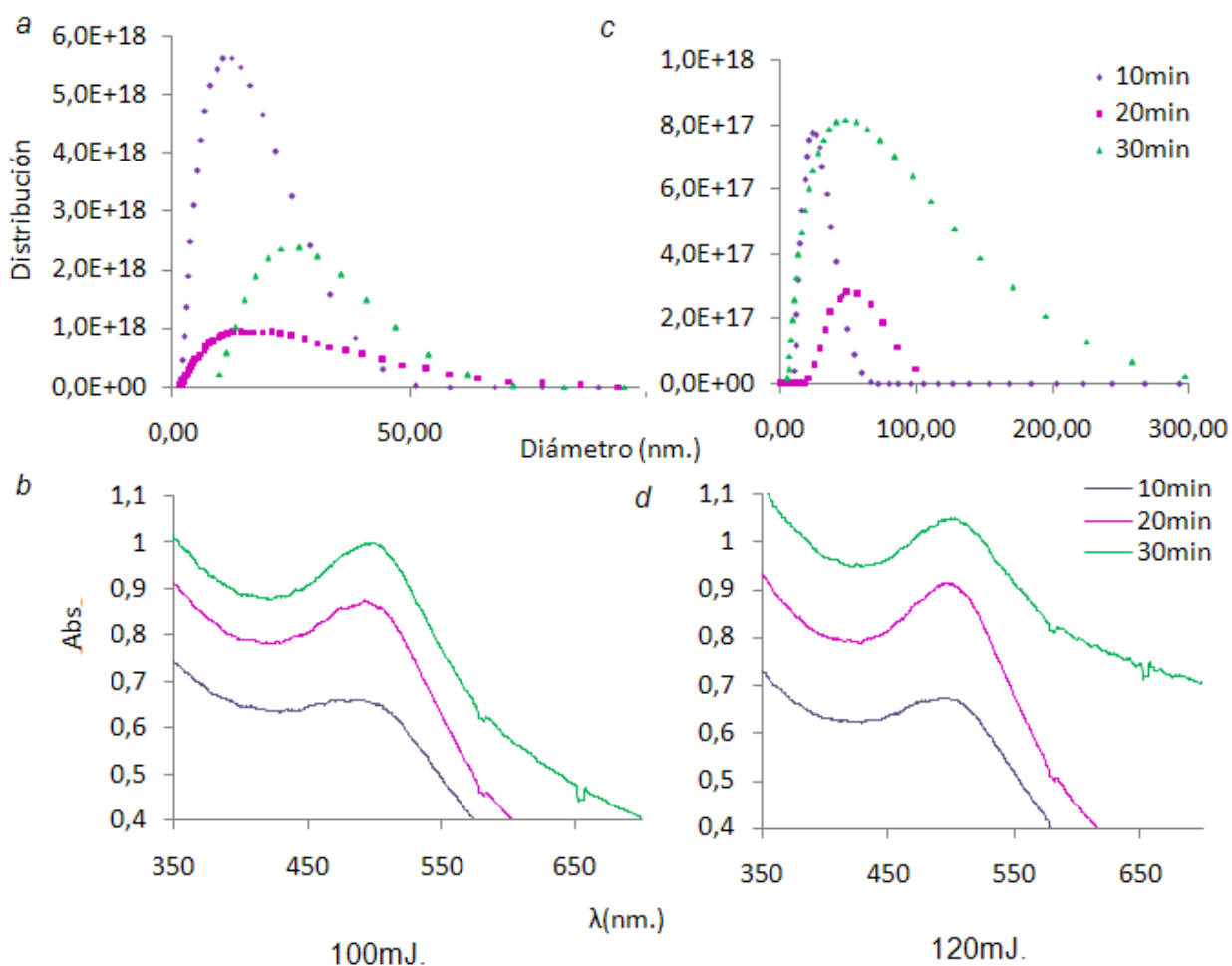


Figura 25. (a) y (c) Distribución de Au-Nps en función del diámetro de las mismas empleando distintos tiempos de ablación; y en (b) y (d) espectros de absorbancia de Au-Nps en función de la longitud de onda. Condiciones experimentales de ablación para la generación de los complejos Au-Nps: 100,0mJ y 120,0mJ, y una solución acuosa de concentración de SDS de $4,5E-2M$

En la figura 25-(a) y 25-(c) se puede apreciar como el diámetro de partícula se incrementa a medida que aumenta el tiempo de ablación utilizado. La tendencia obtenida sugiere que el diámetro se mantiene relativamente constante para intervalos pequeños de tiempo, es decir, de 0 a 10 min se obtienen partículas de diámetro similar, de 10 a 20 min se obtienen partículas de diámetro similar pero de mayor magnitud en comparación a los obtenidos para el intervalo de tiempo anterior y así sucesivamente.

En cuanto al ancho de la distribución de tamaños, se puede ver como esta también se incrementa a medida que se utiliza un tiempo de ablación mayor. Esta tendencia tiene que ver con el incremento en el número de partículas generadas dentro del medio, que a su vez favorece poco a poco la agregación de las mismas y por lo tanto la obtención de una población de Au-Nps con una mayor variedad de tamaños. Los cambios en la forma de las distribuciones a medida que se incrementa el tiempo de ablación pueden ser observados en la figura 25-(a) y 25-(c). En cuanto a los espectros de absorción obtenidos (figura 25-(b) y 25-(d)), se observa un aumento en la absorción a medida que se incrementa el tiempo de ablación. Esto se debe a que, el incremento en la absorción está asociado con el número de Au-Nps en el medio, ya que por Ley de Beer se sabe que la absorción es proporcional a la cantidad de sustancia capaz de absorber radiación en el medio.

En las figuras 25-(a) y 25-(c) se puede apreciar que el diámetro de partícula se incrementa a medida que aumenta el tiempo de ablación. Este resultado sugiere que cuando se emplean tiempos de ablación relativamente pequeños, el diámetro medio de las Nps se mantiene. Mientras que cuando el tiempo de ablación se incrementa, por encima de 15 minutos, las Au-Nps experimentan cambios bastantes apreciables en su tamaño, es decir, de 10 a 30 minutos, el diámetro de las Nps varía desde 12,52 hasta 23,20nm. para 100,0mJ de energía y de 23,20 a 47,70nm. para 120,0mJ de energía.

5.1.4. ESTABILIDAD DE LAS Au-NPS EN EL TIEMPO

En el año 2006, Taraneko N. et al.⁶⁴ estudiaron la estabilidad de una serie de complejos de Au-Nps, encontrando que la longitud de onda correspondiente al valor o pico de máxima absorción de dichas partículas, al finalizar la ablación, aumentaba producto de la agregación en el tiempo. En esta parte de la investigación, se estudió la estabilidad temporal de las Au-Nps generadas en soluciones acuosas con altas concentraciones de SDS, para ello se selecciono una muestra de Au-Nps. Una vez que esta muestra fue sintetizada, se estudiaron los cambios que se producen en los

diámetros (medio e hidrodinámico) con el tiempo. En la tabla 5 se pueden observar los valores obtenidos.

Tabla 5. Condiciones experimentales empleadas para la generación de Au-Nps, vía ablación láser. Estabilidad en el tiempo de las Au-Nps.

Muestra	Tiempo transcurrido.	[SDS] +/-0,2E-2(mol/L)	Energía +/-0,1(mJ.)	T. de ablación. +/-1 (min.)	Max. de abs. +/-0,01(nm.)	Diámetro prom. +/-0,01(nm.)
22	Base	4,5E-2	80,0	20	488,71	15,56
“	1 hora	-	-	-	491,16	26,40
“	2 horas	-	-	-	494,30	30,80
“	1 día	-	-	-	500,92	35,60
“	2 días	-	-	-	506,14	41,00
“	1 semana	-	-	-	508,23	47,20
“	2 semanas	-	-	-	514,13	62,60

En la figura 26 se puede notar en (a) un aumento progresivo del diámetro medio de las Au-Nps a medida que transcurre el tiempo. Esta tendencia sugiere que existen procesos de agregación que experimentan las Au-Nps durante una etapa que denominamos “maduración o envejecimiento de las Au-Nps”. Estos resultados demuestran que los complejos Au-Nps no funcionalizados, generados en soluciones acuosas 4,5E-2M de SDS, resultan dramáticamente inestables en el tiempo. Al mismo tiempo en la figura 26 se muestra en (b) como el máximo de absorbancia, correspondiente al PS de las Au-Nps se desplaza hacia longitudes de onda mayores; esto se debe principalmente al aumento progresivo del diámetro promedio de las Au-Nps que están sufriendo un proceso de envejecimiento.

Entonces, a pesar de que la concentración 4,5E-2M de SDS permite obtener mayor cantidad de Au-Nps con menor tamaño, sus diámetros medios e hidrodinámicos se incrementan muy rápidamente a medida que transcurre el tiempo.

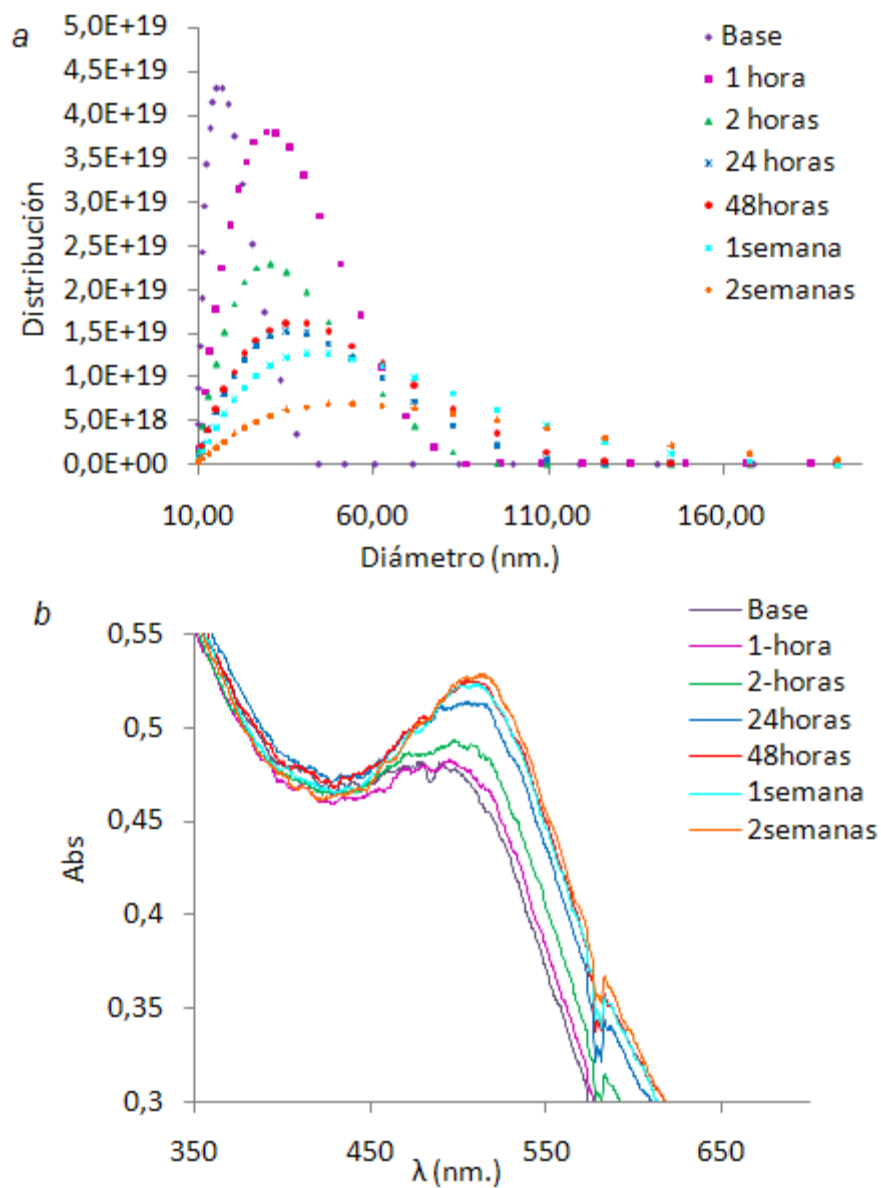


Figura 26. (a) Efecto de los procesos de agregación sobre la distribución de tamaños de las Au-Nps. (b) Efecto de los procesos de agregación sobre la forma de los espectros de las Au-Nps. Condiciones experimentales bajo las cuales se generaron las Nps de oro: 80,0mJ, concentración de SDS 4,5E-2M y tiempo de ablación de 30 minutos.

5.2. DETERMINACION DE MERCURIO

Una vez que las Au-Nps son sintetizadas y caracterizadas, dichas Au-Nps son usadas como sensor para determinar mercurio (II) en agua; para ello las soluciones de Au-Nps son puestas en contacto con: (i) soluciones acuosas de mercurio (II) de manera directa y (ii) soluciones acuosas de mercurio (II) a través de un generador de hidruros, usando como agente reductor borohidruro de sodio, para producir vapor de mercurio (0).

5.2.1. SENSIBILIDAD DEL SISTEMA DE Au-NPS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SOLUCIONES ACUOSAS DE MERCURIO (II)

En esta parte de la investigación, para la determinación de mercurio (II) se toman alícuotas conocidas de la solución de Au-Nps y se colocan en un vial; luego a estas soluciones se les agrega un volumen de concentración conocida de solución de mercurio (II) tal como se muestra en la tabla 6. Posteriormente se toma la medida de los espectros UV-Visible de las muestras obtenidas.

Tabla 6. Condiciones para observar la respuesta de las Au-Nps a soluciones de diferentes concentraciones de mercurio (II)

Muestra	Volumen de Au-Nps. +/-0,01(mL.)	Volumen de sol. de Hg(II) +/-0,01(mL.)	Concentración de sol. Hg(II) (ppb)
1	3,00	0,00	0,0
2	"	2,00	1,00+/-0,01
3	"	"	5,00+/-0,02
4	"	"	10,0+/-0,1
5	"	"	50,0+/-0,2
6	"	"	500+/-1
7	"	"	1000+/-3

En la figura 27 se observan los espectros UV-Visible tomados para las muestras.

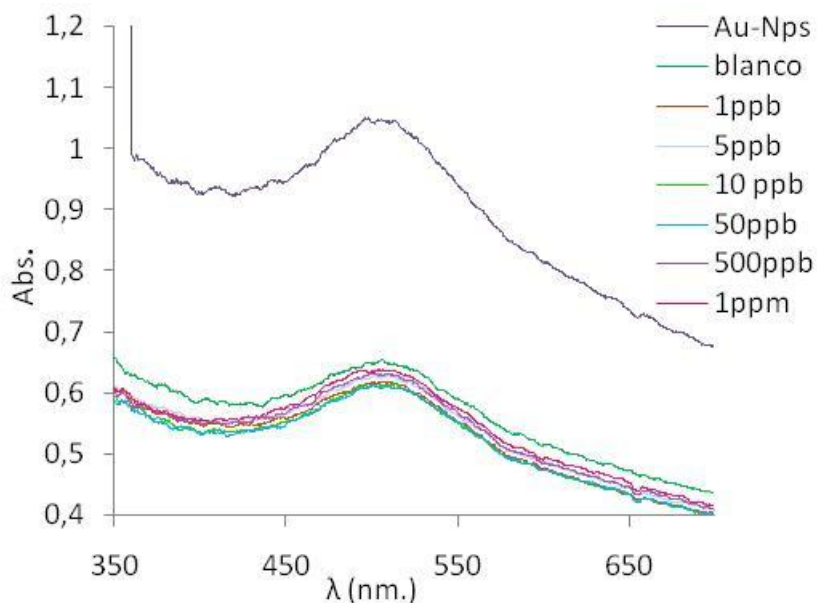


Figura 27. Espectros UV-Visible de las muestras de Au-Nps en presencia de soluciones de diferentes concentraciones de mercurio (II)

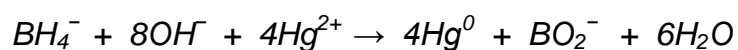
En la figura 27 se observa que ocurre una disminución drástica del valor de la señal de absorbancia con la presencia de mercurio; esto debido principalmente al proceso de dilución al que son sometidas las Au-Nps. Al incrementarse el volumen total de la solución el máximo de absorbancia que corresponde al plasmón superficial se ve afectado de manera que disminuye su valor. Adicionalmente en la figura 27 se puede apreciar que para diferentes concentraciones de mercurio (II) se obtienen valores muy similares de absorbancia; los resultados muestran que existe una relación de absorbancia con la concentración de mercurio. Esto se debe a que ocurre una asociación favorable entre las Au-Nps y el mercurio (se forma una amalgama entre ellos) de esta manera al quedar una menor cantidad de Au-Nps en el medio, se observa una disminución del valor de la señal de absorbancia. En el caso de la especie iónica Hg^{2+} ocurre una interacción de tipo física entre el ion Hg^{2+} y las Au-Nps, similar a la mencionada, pero dicha interacción es muy pobre; es por ello que no se observa cambios aparentes entre concentraciones de diferentes valores.⁶⁵ sin embargo, para

poder observar un cambio en la absorbancia, con las concentraciones de Hg^{2+} es necesario aumentar la fuerza de dicha interacción a través de la funcionalización de las Au-Nps. Tal y como lo reportan Chih–Ching H. et al. en el año 2006 ellos desarrollaron un sensor basado en nanopartículas de oro (Au-Nps) para la determinación de Hg (II) en soluciones acuosas; ellos mejoraron la selectividad del sensor mediante la modificación de las superficies de Au-Nps con ligandos tioles y la adición de un ligando quelante; de esta manera los iones Hg^{2+} son atrapados por los ligandos asociados a las Au-Nps. Dicho sensor presento un LOD de 2,0ppb de Hg^{2+} en medidas realizadas en agua de estanque.⁶⁶

5.2.2. RESPUESTA DE LAS Au-NPS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE MERCURIO (II) USANDO EL METODO DE GENERACION DE VAPOR.

Para evitar la funcionalización de las Au-Nps, que acarrea un proceso largo y costoso en cuanto a la generación de Au-Nps; se prueba la generación de vapor frío; usando el borohidruro de sodio como agente reductor, y de igual manera eliminar toda fuente de interferencia, ya que el mercurio es el único metal que forma vapor atómico a bajas temperaturas.

Luego de probar la adición de soluciones acuosas de mercurio (II) de manera directa; se procede a determinar mercurio (II) usando el método de generación de vapor. Para ello a las soluciones de Au-Nps, se les hace pasar una corriente de Hg^0 procedente de la reducción del Hg^{2+} en solución; en este caso se usa como agente reductor el NaBH_4 y toda la reacción se conoce como método de vapor frío:



Este Hg^0 producto de la reacción de reducción, se genera en forma de vapor y el mismo es burbujeado en las soluciones que contienen las Au-Nps tal como se muestra en la figura 28.

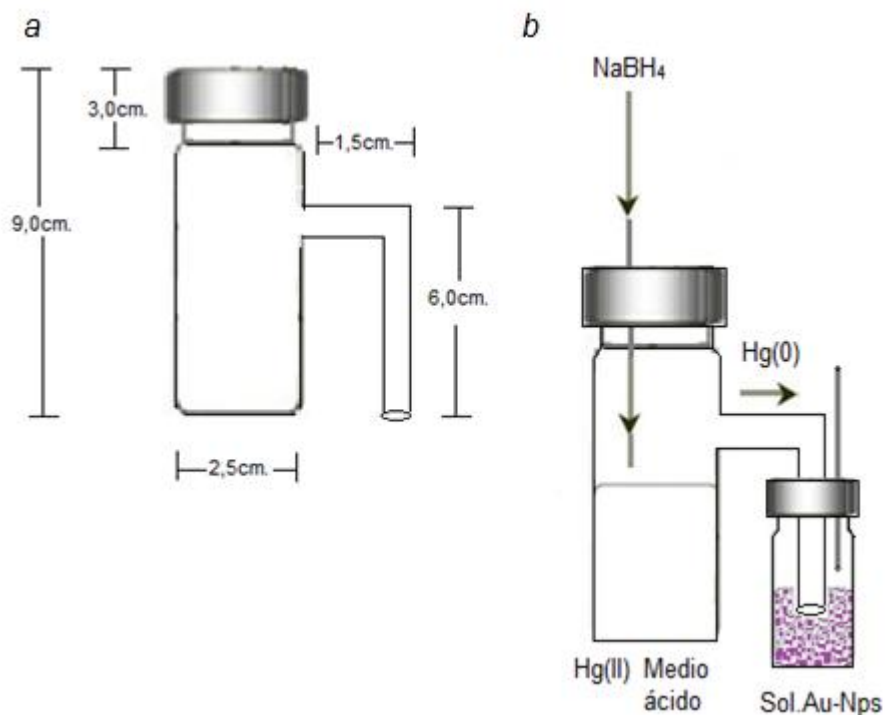


Figura 28. (a) dimensiones del reactor para el sistema. (b) sistema para la generación de vapor de mercurio.

En la generación de vapor de mercurio, es necesario trabajar en medio ácido para favorecer la reacción de reducción; con este fin se utiliza una solución al $(5,00 \pm 0,01)\%$ de HNO_3 ; como agente reductor se prepara una solución al $(0,20 \pm 0,01)\%$ de NaBH_4 ; y finalmente a fin de observar cambios se trabajó con diferentes concentraciones de Hg^{2+} tal como se muestra en la tabla 7:

Tabla 7. Condiciones para observar la respuesta de las Au-Nps a diferentes concentraciones de mercurio (II). Técnica de vapor frío.

Muestra	Volumen de Au-Nps. +/-0,01(mL.)	Volumen de sol. de Hg(II) +/-0,01(mL.)	Volumen de HNO ₃ ((5,00%) +/-0,01(mL.)	Volumen de NaBH ₄ (0,20%) +/-0,1(mL.)	Concentración de sol. Hg(II) (ppb)
1	3,00	0,0	1,00	4,0	0,0
2	"	3,0	"	"	1,00+/-0,01
3	"	"	"	"	5,00+/-0,02
4	"	"	"	"	10,0+/-0,1
5	"	"	"	"	50,0+/-0,2
6	"	"	"	"	100+/-1

Una vez que se burbujeó el Hg⁰ en las soluciones de Au-Nps, se tomaron los respectivos espectros de UV-Visible de las muestras; en la figura 29 se muestran dichos espectros.

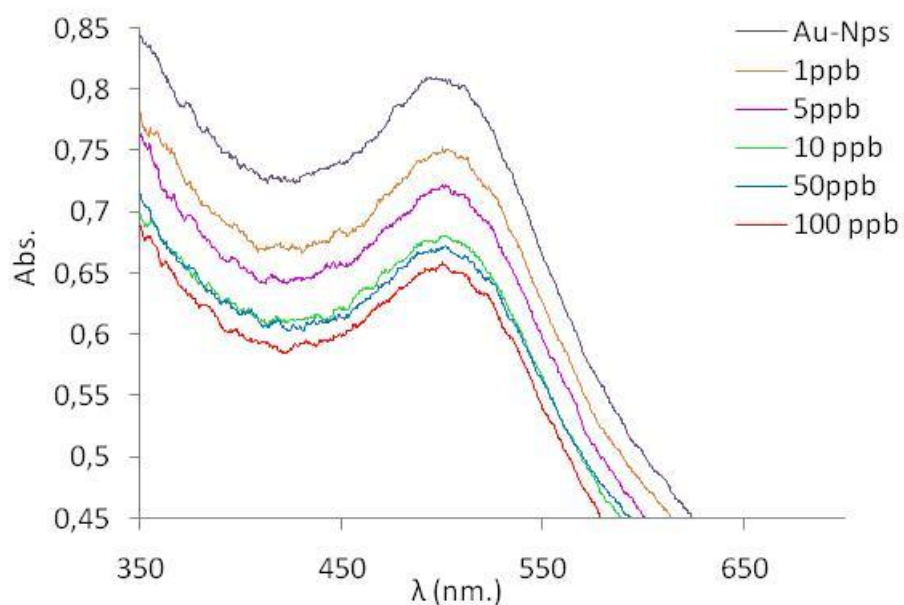


Figura 29 Espectros UV-Visible de las muestras de Au-Nps en presencia de soluciones de diferentes concentraciones de mercurio (II) a través de un generador de vapor de mercurio.

En la figura 29 se puede observar como la señal decae a medida que se aumenta la concentración de mercurio; esta disminución en la señal de absorbancia ocurre debido a que hay mayor cantidad de mercurio durante el proceso y por ende una menor cantidad de Au-Nps libres; como se sabe se produce un amalgamiento entre el Hg^0 y la superficie de las partículas⁶⁷. En el año 2009, M. A. Ortega et al. desarrollaron un sensor de mercurio basado en nanopartículas coloidales de oro. El sensor de mercurio está basado en la inhibición de fluorescencia que ejercen nanopartículas (Nps) coloidales de oro sobre la Rodamina560. Se observó un incremento en la emisión de fluorescencia de la solución NPS-Rodamina en presencia del Hg^0 . Estos resultados fueron atribuidos a que el Hg^0 amalgama la partícula, rompiendo de esta manera su asociación con el colorante, liberándolo y presentando nuevamente su emisión radiativa característica.⁶⁷

Para soportar esta información, en el año 2009 Lisha K. et al. reportaron la formación de una capa amorfa de mercurio sobre la superficie de las Au-Nps. Ellos consiguieron observar dicha capa usando un microscopio de fuerza atómica.⁶⁸ Así mismo es importante destacar que dicha disminución en la absorbancia se produce a concentraciones bajas de mercurio, lo que garantiza una alta sensibilidad para el sensor.

Por lo anteriormente expuesto es posible detectar la presencia de mercurio en soluciones acuosas, mediante la determinación de la variación de la señal de absorbancia del sistema Au-Nps-SDS.

5.3. EVALUACIÓN DEL SENSOR COMO MÉTODO ANALÍTICO.

En esta parte del trabajo; se evalúa el potencial analítico del sistemas Au-Nps con generación de vapor de mercurio, como sensor para determinar mercurio(II) en disoluciones acuosas; para ello se construye una curva de calibración a partir de la respuesta de la señal de absorbancia de las Au-Nps, a soluciones de mercurio(II) de

concentraciones conocidas; todo esto con el fin de estudiar las figuras de mérito del sistema, tales como: sensibilidad, límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ) y límite de linealidad (LOL) posteriormente estos valores son comparados con los obtenidos por la técnica de fluorescencia atómica con vapor frío, en la figura 30 se observa la fotografía del espectrómetro de fluorescencia atómica con generación de vapor frío, utilizado en este trabajo.



Figura 30. Espectrómetro de fluorescencia atómica con vapor frío para análisis de mercurio.

En la tabla 8 se presentan los datos de los reactivos usados en el sistema Au-Nps con generación de vapor de mercurio.

Tabla 8. Condiciones para observar la respuesta de la señal de las Au-Nps a diferentes concentraciones de mercurio (0). Técnica de vapor frío.

Muestra	Volumen de Au-Nps. +/-0,01(mL.)	Volumen de sol. de Hg(II) +/-0,01(mL.)	Volumen de HNO ₃ (5,00%) +/-0,01(mL.)	Volumen de NaBH ₄ (0,20%) +/-0,1(mL.)	Concentración de sol. Hg(II) (ppb)
1	3,0	0,0	1,0	4,0	0,0
2	"	3,0	"	"	0,200 +/-0,002
3	"	"	"	"	1,00 +/-0,01
4	"	"	"	"	5,00+/-0,02
5	"	"	"	"	10,0+/-0,1
6	"	"	"	"	50,0+/-0,2

La curva de calibración para el sistema de Au-Nps con generación de vapor frío, se presenta en la figura 31. los patrones son medidos por duplicado con un coeficiente de variación de 8%. usando un espectrómetro UV-Visible

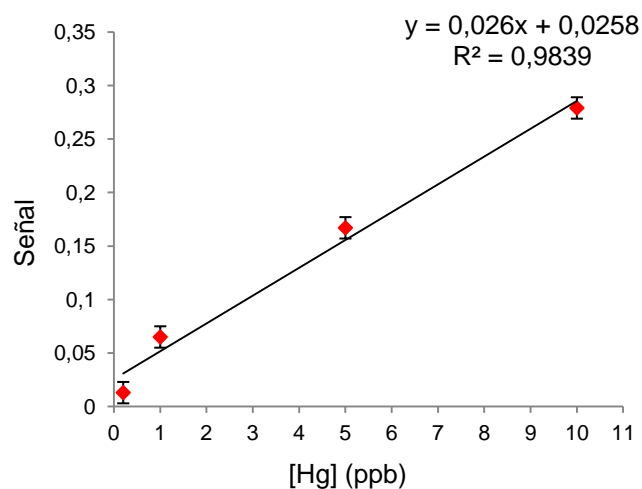


Figura 31. Curva de calibración para el sistema de Au-Nps con generación de vapor de mercurio.

Para realizar las medidas en el equipo de fluorescencia atómica, se preparan los siguientes reactivos: una solución (1,80 \pm 0,01)% de HCl; como agente reductor se usa cloruro de estaño y se prepara en una solución (2,00 \pm 0,01)% de SnCl₂ en (3,60 \pm 0,01)% de HCl. Para la curva de calibración se usan los datos que se observan la tabla 9.

Tabla 9. Condiciones para realizar las medidas en el equipo de fluorescencia atómica.

Muestra	Volumen de HCl (1,80%) (mL.)	Volumen de sol. de SnCl ₂ (2,00%) en HCl (3,60%) (mL.)	Volumen sol.de Hg(II) (mL.)	Concentración de sol. Hg(II) (ppb)
1	c/n	c/n	c/n	0,0
2	"	"	"	0,200 \pm 0,002
3	"	"	"	0,50 \pm 0,01
4	"	"	"	1,00 \pm 0,01
5	"	"	"	3,00 \pm 0,02
6	"	"	"	5,00 \pm 0,02

La curva de calibración para el sistema de fluorescencia atómica se presenta en la figura 32. el equipo mide la fluorescencia de los patrones por cuadruplicado con un coeficiente de variación de 2%.

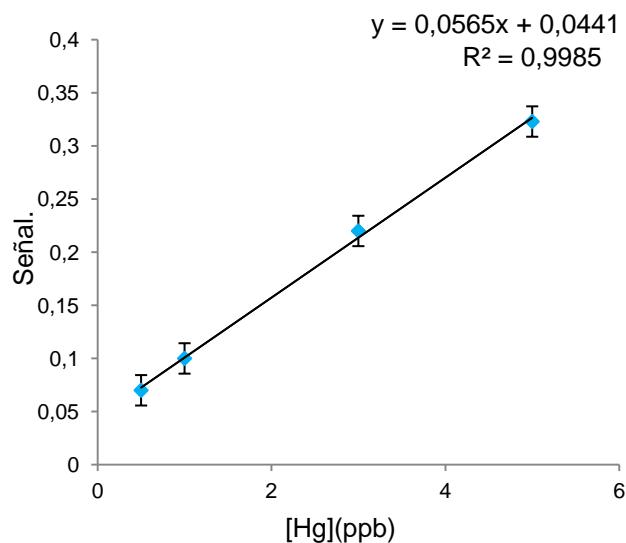


Figura 32. Curva de calibración para espectrómetro de fluorescencia atómica con vapor frío para análisis de mercurio.

Una vez construidas las curvas de calibración, se procede a calcular las figuras de mérito correspondientes a cada método. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 10.

Tabla 10. Figuras de mérito para ambos métodos.

Método	Sensibilidad Señal/(ppb)	LOD (ppt)	LOQ (ppt)	Linealidad (ppb)
Equipo fluorescencia atómica.	0,0565	91,0	321,0	0,2 - 5,0
Sistema Au-Nps	0,026	175,0	525,0	0,2 - 10,0

Las figuras de mérito se utilizan regularmente con el propósito de describir una determinada técnica y comparar sus propiedades analíticas con las provistas por otras técnicas; en la tabla 10 se presentan los resultados obtenidos del cálculo de la figuras de mérito para las técnicas y se observa que: (i) el sensor es menos sensible que el equipo de fluorescencia atómica; es decir, el cambio de la respuesta de la señal frente a la concentración es pequeño; (ii) los límites de detección y de cuantificación para el sensor son mayores que los obtenidos del método de fluorescencia, (iii) el rango de linealidad es más amplio para el sensor con respecto al calculado para la técnica de fluorescencia atómica, con vapor frío.

En cuanto alcance del sensor como técnica analítica, se puede decir que: aunque el cambio de respuesta de la señal frente a la concentración o sensibilidad, es menor que la obtenida con la técnica convencional; el mismo permite cuantificar cantidades de mercurio (II) bastante cercanas entre sí; a su vez los límites de detección y cuantificación son lo suficientemente bajos como para determinar mercurio (II) en unidades de concentración del orden de los ppb; esta característica es muy importante, ya que un posible uso del sensor es la determinación de mercurio (II) en aguas contaminadas; según la agencia de protección ambiental de estados unidos (EPA) el valor permisible de mercurio (II) en agua es de 1,00ppb; y este valor está por encima del límite de cuantificación la técnica. Por otra parte hay que destacar el hecho de que el sistema Au-Nps con generación de vapor de mercurio es muy selectivo; ya que el mercurio es el único metal que forma vapor atómico a temperatura ambiente y de esta manera se eliminan las interferencias que podrían surgir por la presencia de otros metales pesados en el medio. Finalmente se puede decir que el sensor es preciso, ya que los datos obtenidos de la señal para las replicas, concuerdan entre sí, lo que se traduce en una desviación estándar de 0,05.

6. CONCLUSIONES

La técnica de ablación láser es una vía altamente eficiente, muy rápida, de fácil manejo, que permite generar nanopartículas metálicas. En esta investigación, se prepararon por medio de esta técnica, diferentes soluciones de Au-Nps en un entorno acuoso de dodecil sulfato de sodio (SDS). Concentraciones de SDS de $4,5E-2M$ permiten obtener mayor cantidad de Au-Nps con espectros que presentan una mayor absorción. se pueden obtener Au-Nps generadas en una solución acuosa $4,5E-2M$ de SDS, con tamaños del orden de los 20,00nm. manifestando procesos de agregación a largo plazo, estas partículas pueden encontrarse eficientemente estabilizadas por periodos de tiempo comprendidos entre 1 y 2 semanas.

La cantidad de Au-Nps generada se ve afectada por tres importantes variables: (i) concentración del estabilizante, (ii) energía del láser y (iii) tiempo de ablación.

Aumentos en la energía del láser influyen positivamente en la cantidad de Au-Nps generadas en el medio; a medida que se incrementa la energía, aumenta la cantidad de Nps y disminuye el diámetro medio de partícula. Aumentos en el tiempo de ablación generan altas concentraciones de Nps en el medio, incrementándose, a su vez, el diámetro de partícula. Cuando se emplean tiempos de ablación relativamente pequeños, el diámetro medio de las Nps se mantiene casi constante. A medida que se incrementa el tiempo de ablación, por encima de 20 minutos, las Au-Nps experimentan significativos cambios en su tamaño.

Se comprobó que existe una correlación entre la longitud de onda del máximo de absorción de las Au-Nps y el diámetro promedio de estas. Nanopartículas de mayor diámetro promedio absorben energía a una frecuencia menor y por tanto, a longitudes de onda más grande y nanopartículas con menor diámetro promedio absorben energía a una frecuencia mayor y por tanto, longitudes de onda más pequeña. Se cree que este comportamiento es debido al fenómeno de cuantización de tamaño, que no es más que la cuantización del filo de las bandas de conducción y de valencia en una nanopartícula de oro y al aumento de su brecha de banda ocasionado por el confinamiento espacial

de los electrones. A medida que el diámetro promedio de la nanopartícula disminuye, el confinamiento espacial de sus electrones aumenta resultando en un aumento en el espaciado entre los niveles y en su brecha de banda.

Se puede determinar cuantitativamente mercurio (II) en soluciones acuosas usando como sensor el sistema Au-Nps-SDS. a través de la construcción de una curva de calibración utilizando diferentes concentraciones conocidas de mercurio (II) y de esta manera, determinar la concentración de mercurio en muestras desconocidas.

Se evaluó la capacidad analítica del sensor, con el estudio de las figuras de mérito; a su vez estos valores fueron comparados con los obtenidos de un Espectrómetro de fluorescencia atómica con vapor frío y aunque la sensibilidad del sensor es menor y el límite de detección es mayor que los obtenidos con el espectrómetro de fluorescencia atómica; el sensor presenta una excelente precisión y un límite de cuantificación suficientemente bajo (0,5ppb) como para medir mercurio en muestras de aguas potencialmente contaminadas.

Finalmente es necesario evaluar la efectividad del sensor ante muestras reales y a su vez estudiar la exactitud del mismo a través la determinación de la concentración de mercurio (II) en patrones certificados. También es importante idear la forma de hacer del sensor un sistema portátil que permita medir concentraciones de mercurio (II) en trabajos de campo.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Stern, A. H. *Environ. Res.* 2005. 98, 133-142.
2. Wang, Q.; Kim, D.; Dionysiou, D. D.; Sorial, G. A.; Timberlake, D. *Environ. Pollut.* 2004, 131, 323-336.
3. Mutter, J.; Naumann, J.; Schneider, R.; Walach, H.; Haley, B. *Neuroendocrinol. Lett.* 2005, 26, 439-446.
4. Hoyle, I.; Handy, R. D. *Aquat. Toxicol.* 2005, 72, 147-159.
5. Butler, O. T.; Cook, J. M.; Harrington, C. F.; Hill, S. J.; Rieuwerts, J.; Miles, D. L. J. *Anal. At. Spectrom.* 2006, 21, 217-243.
6. Nolan, E. M.; Lippard, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 14270-14271.
7. (a) Thomas, J. M.; Ting, R.; Perrin, D. M. *Org. Biomol. Chem.* 2004, 2, 307-312. (b) Ono, A.; Togashi, H. *Angew. Chem., Int. Ed.* 2004, 43, 4300-4302. (c) Kim, I.-B.; Bunz, U. H. F. *J. Am. Chem. Soc.* 2006, 128, 2818-2819.
8. (a) He, X.; Liu, H.; Li, Y.; Wang, S.; Li, Y.; Wang, N.; Xiao, J.; Xu, X.; Zhu, D. *Adv. Mater.* 2005, 17, 2811-2815. (b) Kim, Y.; Johnson, R. C.; Hupp, J. T. *Nano Lett.* 2001, 1, 165-167. (c) Liu, J.; Lu, Y. *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127, 12677-12683.
9. Ramirez, M.; Gabilan, A.; Castro, J. "La contaminación por mercurio en México". *Gaceta ecológica* 2004 0,72; 21-34.
10. "Mercury" National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals. CAS No. 7439-97-6
11. "El Mercurio en el Sector de la Salud" Organización Mundial de la Salud. WHO-2005.
12. Ver referencia 10.
13. Ortega, M. A.; Echevarría, L.; Castillo, J.; Fernández, A. "sensor de mercurio basado en nanopartículas coloidales de oro" Seventh LACCEI Latin American and Caribbean Conference for Engineering and Technology (LACCEI-2009).
14. Ver referencia 10.
15. Ver referencia 10.

16. Gopala, K.; Darbha, A.R.; Paresh C. R. "Gold Nanoparticle-Based Miniaturized Nanomaterial Surface Energy Transfer Probe for Rapid and Ultrasensitive Detection of Mercury in Soil, Water, and Fish" Department of Chemistry, Jackson State University, Jackson, Mississippi 39217- American Chemical Society. 2007. VOL. 1 NO.3
17. Selid P. D.; Xu H.; Collins E.M.; Striped M. ; Zhao, J. X. "Sensing Mercury for Biomedical and Environmental Monitoring" Sensors 2009, 9, 5446-5459.
18. Costero, A.M.; Grupo de investigación. "Química orgánica de complejos metálicos" Departamento de química orgánica del la facultad de química de Valencia-España.
19. Guo, L.; Zhang, W.; Xie, Z.; Lin, X.; Chen, G. An Organically Modified Sol-gel Membrane for Detection of Mercury Ions by Using 5,10,15,20-tetraphenylporphyrin as a Fluorescence Indicator. Sens. Actuat. B 2006, 119, 209–214.
20. Segura-Carretero, A.; Costa-Fernandez, J.M.; Pereiro, R.; Sanz-Medel, A. Low-level "Mercury Determination with Thiamine by Fluorescence Optosensing" Talanta 1999, 49, 907–913.
21. Ver referencia 17.
22. Ver referencia 16.
23. Mansoori G. "Principles of Nanotechnology. Woeld Scientific. 1-2005.
24. Perez, A. "Uso de la dispersion de hiper rayleigh para el estudio y caracterizacion de nanoparticulas de oro" Tesis para optar el título de Licenciada en química en la Universidad Central de Venezuela. Abril octubre-2010.
25. Quintana Ruiz, M. et al. "Nanopartículas: principios y aplicaciones". Revista Ciencia y Desarrollo, Julio 2008, Vol. 34, no. 221, p. 62-67.
26. Younan X.; Byron G.; Yadong Y.; Yu L., "Monodispersed Colloidal Spheres: Old Materials with New Applications". Adv. Mater. 12-2000. 693 - 713.
27. Ver referencia 26.
28. Ver referencia 24.

29. De la Venta G., J. "Propiedades Magnéticas de Nanopartículas de Oro". Tesis para optar al grado de doctor en Ciencias Físicas por la Universidad Complutense de Madrid. España, Enero-2009.
30. Ver referencia 24.
31. Ortega Machuca, M.A. "Obtención de Nanopartículas de Oro y Caracterización Empleando Métodos Ópticos". Tesis para optar el título de Licenciada en química en la Universidad Central de Venezuela. Abril-2007.
32. Ver referencia 26.
33. Ver referencia 24.
34. Grande A. H., "Nanotecnología y Nanopartículas Magnéticas: La Física Actual En Lucha Contra La Enfermedad". Rev. R. Acad. Cienc. Exact. Fís. Nat. España. VIII Programa de Promoción de la Cultura Científica y Tecnológica. 101-2007. 321-327.
35. Ver referencia 26.
36. Ver referencia 29.
37. Mafuné F., Kohno J., Takeda Y., y Kondow T., "Formation of Gold Nanoparticles by Laser Ablation in Aqueous Solution of Surfactant". J.Phys. Chem. B 105 (2001) 5114-5120.],
38. Zhang C., Zhang Y., Wang X., Tang Z., y Lu Z., "Hyper-Rayleigh Scattering of Protein-Modified Gold Nanoparticles". Anal. Biochem. 320-2003. 136-140.
39. Amendola V., y Meneghetti M., "Laser Ablation Synthesis in Solution and Size Manipulation of Noble Metal Nanoparticles". Phys. Chem. Chem. Phys., 11. (2009) 3805–3821.
40. García Vidal F., y Martín Moreno L., "Plasmones Superficiales". Revista de Investigación y ciencia, Octubre-2008. 66-76.
41. Ver referencia 38.
42. Ver referencia 29.
43. Ver referencia 38.
44. Hannink, R. H. J. y Hill, A. J. "Nanostructure control of materials". Woodhead 1-2006.

45. Ver referencia 24.
46. Ver referencia 40.
47. Ver referencia 26.
48. Ver referencia 38.
49. Hutter E, Fendler J. Exploitation of Localized Surface Plasmon Resonance. *Adv. Mater.* 2004, 16, 19, 1685-1706.
50. S. Nath, S. K. Ghosh, S. Kundu, S. Praharaj, S. Panigrahi and T. Pal, J. Silver organosol: synthesis, characterisation and localised surface plasmon resonance study. *New J. Chem.*, 2005, 29, 1527 – 1534.
51. Berne, B. J., and R. Pecora. *Dynamic Light Scattering with Application to Chemistry, Biology and Physics.* Wiley, New York. (1976).
52. Stephan L., y Mostaza E., "Spectral Properties and Relaxation Dynamics of Surface Plasmon Electronic Oscillations in Gold and Silver Nanodots and Nanorods". *J. Phys. Chem. B* 103-1999. 8410.
53. Chih-Ching, H. y Huan-Tsung, C. "Selective Gold-Nanoparticle-Based "Turn-On" Fluorescent Sensors for Detection of Mercury(II) in Aqueous Solution. *Anal. Chem.* 2006, 78, 8332-8338.
54. Darbha, G.K.; Ray, A.; Ray, C.P. "Gold Nanoparticle-Based Miniaturized Nanomaterial Surface Energy Transfer Probe for Rapid and Ultrasensitive Detection of Mercury in Soil, Water, and Fish" Department of Chemistry, Jackson State University, Jackson, Mississippi 39217- American Chemical Society. 2007. VOL. 1 NO.3. 208-214.
55. Chen J, Zheng A, Chen A, Gao Y, He C, Kai X, Wu G, Chen Y "A functionalized gold nanoparticles and Rhodamine 6G based fluorescent sensor for high sensitive and selective detection of mercury(II) in environmental water samples." *Anal Chim Acta* 2007; 5; 599; 134-142
56. Wang H., Wang Y., Jin J., Yang R. "Gold Nanoparticle-based colorimetric and "Turn-On" Fluorescent probe for Mercury(II) ions in Aqueous Solution". *Anal. Chem.* 2008, 80, 9021-9028.

57. Ver referencia 13.
58. Wang Y., Yang F., Yang X. "colorimetric biosensing of Mercury(II) ions using unmodified gold nanoparticle probes and thrombin-binding aptamer" 2010. *Biosens. Bioelectron.* 25, 1994-1998.
59. Ver referencia 37.
60. Ver referencia 24.
61. Yamada K., Tokumoto Y., Nagata T., Mafuné F., "Mechanism of laser induced size-reduction of gold nanoparticles as studied by nanosecond transient absorption spectroscopy" *J. Phys. Chem. B.*, 110 (2006) 11751-11756.
62. Ver referencia 37.
63. Takami A., Kurita H., y Koda S., "Laser induced size reduction of noble metal particles in aqueous solutions" *J. Phys. Chem. B.*, 103 (1999) 1226-1232.
64. Tarenseko N., Butsen A., Nevar E., Savastenko N., "Synthesis of nanosized particles during laser ablation of gold in water". *Appl. Surf. Science*, 252 (2006) 4439-4444.
65. Lisha K.P. Anshup and Pradeep T. "Towards a practical solution for removing inorganic mercury from drinking water using gold nanoparticles" *Gold Bulletin*, 42(2009), 2, 144-152.
66. Ver referencia 53.
67. Ver referencia 13.
68. Ver referencia 65.