

**DETECCIÓN COLORIMÉTRICA DE PLOMO Y NÍQUEL EN AGUAS
UTILIZANDO NANOPARTÍCULAS DE ORO SINTETIZADAS CON QUITOSÁN**

FRANCISCO JAVIER FLÓREZ BARAJAS

**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
MAESTRÍA EN QUÍMICA
PAMPLONA, COLOMBIA
2019**

**DETECCIÓN COLORIMÉTRICA DE PLOMO Y NÍQUEL EN AGUAS
UTILIZANDO NANOPARTÍCULAS DE ORO SINTETIZADAS CON QUITOSÁN**

FRANCISCO JAVIER FLÓREZ BARAJAS

Trabajo de investigación presentado como requisito para optar al título de:

Magister en Química

Directora

PhD. ZAYDA CONSTANZA SÁNCHEZ ACEVEDO

Codirector

PhD. HERIBERTO PEÑA PEDRAZA

**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
MAESTRÍA EN QUÍMICA
PAMPLONA, COLOMBIA**

2019

Nota de aceptación:

Firma del presidente del jurado

Firma del jurado

Firma del jurado

DEDICATORIA

De manera muy especial dedico este trabajo a mi esposa Karen Díez por ser la mujer quien cada día me motiva a salir adelante y aprobar cada uno de los objetivos trazados, también cada vez que realice trabajos como este, en mis dedicatorias no podrá faltar mi familia y en especial mi madre Irene Barajas quien siempre ha sido y será una de mis mayores fuentes de inspiración.

AGRADECIMIENTOS

Quiero inicialmente dar gracias a Dios, por ser siempre la energía para seguir adelante y ser la fuente de ayuda espiritual para poder conseguir este nuevo peldaño de mi vida profesional, también a todas las personas que me colaboraron, a la Universidad de Pamplona por ser la Institución Educativa que me ha brindado todo su apoyo y me formado ofreciéndome los conocimientos necesarios para el desarrollo como profesional.

Igualmente, agradezco a mi directora Zayda Sánchez por todos su apoyo y aportes al proyecto, a mi codirector Heriberto Peña por su colaboración, a mis jurados por sus excelentes contribuciones y aportes, asimismo a la directora de la Maestría en Química Alexandra Torres por su amable contribución en cada uno de los procesos de la maestría, a la colega Sol por su cooperación, al geólogo Carlos Chacón por su ayuda en la caracterización y finalmente a toda mi familia por su apoyo moral.

CONTENIDO

	pag
RESUMEN	10
ABSTRACT	11
INTRODUCCIÓN	12
1. MARCO TEÓRICO	13
1.1 NANOTECNOLOGÍA	14
1.2 NANOPARTÍCULAS	14
1.3 NANOPARTÍCULAS METÁLICAS	15
1.3.1 NANOPARTÍCULAS DE ORO	15
1.4 SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS	16
1.4.1 SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS EN MICROEMULSIÓN	16
1.4.2 SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS EN SISTEMAS COLOIDALES	17
1.4.3 SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS EN FASE ACUOSA	18
1.5 SÍNTESIS VERDE DE NANOPARTÍCULAS	20
1.5.1 QUITOSÁN EN SÍNTESIS VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE ORO	20
1.6 CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS	22
1.6.1 BANDA DE PLASMONES DE SUPERFICIE LOCALIZADOS	23
1.7 FUNCIONALIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS	24
2. METODOLOGÍA	26
2.1 SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE ORO	26
2.1.1 PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE LA SAL METÁLICA	26
2.1.2 PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES REDUCTORAS DE QUITOSÁN	26
2.2 CARACTERIZACION DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO	26
2.3 FUNCIONALIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO	26
2.4 COMPORTAMIENTO DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO	27
2.5 VALIDACIÓN DEL NANOSENSOR	27
2.5.1 TIEMPO DE ANÁLISIS DEL NANOSENSOR DE AuNPS	27
2.5.2 SENSIBILIDAD DEL NANOSENSOR DE AUNPS	27
2.5.3 SELECTIVIDAD DEL NANOSENSOR DE AUNPS	28
2.5.4 ESTABILIDAD DEL NANOSENSOR DE AUNPS	28
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
3.1 SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE ORO	29
3.2 CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO	30
3.2.1 CARACTERIZACIÓN DE LAS AUNPS POR UV –VISIBLE	31
3.2.2 DISPERSIÓN DINÁMICA DE LUZ (DLS)	32

3.2.3	MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)	32
3.3	FUNCIONALIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO	32
3.4	VALIDACIÓN DEL NANOSENSOR	33
3.4.1	TIEMPO DE ANÁLISIS	34
3.4.2	SENSIBILIDAD DEL NANOSENSOR DE AUNPS	35
3.4.3	ESTABILIDAD DEL NANOSENSOR DE AUNPS	37
3.4.4	SELECTIVIDAD DEL NANOSENSOR	38
4.	CONCLUSIONES	40
5.	RECOMENDACIONES	41
6.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Tiempos de detección para Pb^{+2}	32
Tabla 2. Tiempos de detección para Ni^{+2}	32

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Variación de las propiedades ópticas de AuNPs con el tamaño	15
Figura 2. Obtención de quitosán a partir del exoesqueleto de crustáceos	20
Figura 3. Estructuras químicas de la quitina y quitosán	21
Figura 4. Quitosán como agente reductor	22
Figura 5. Banda de absorción del plasmón de las AuNPs	23
Figura 6. Solución acuosa del ácido tetracloroáurico trihidratado	28
Figura 7. Síntesis de AuNPs a diferentes concentraciones de quitosán	28
Figura 8. Espectro de absorción UV-Visible de AuNPs	30
Figura 9. Imagen obtenida de análisis por DLS	31
Figura 10. Imágenes obtenidas por análisis de SEM	32
Figura 11. Abundancia relativa de los elementos en la muestra analizada por SEM	33
Figura 12. Detección del nanosensor a diferentes concentraciones	35
Figura 13. Espectro de absorción de AuNPs mas solución de Pb^{+2}	35
Figura 14. Nanopartículas sintetizadas y almacenadas por 10 días a temperatura ambiente	36
Figura 15. Detección de metales utilizando las AuNPs pasados 10 días	37
Figura 16. Detección con AuNPs almacenadas a 4°C	37
Figura 17. AuNPs mas solución acuosa de cloruro de cobalto	38
Figura 18. AuNPs mas solución acuosa de cloruro de potasio	38

RESUMEN

En el presente trabajo se desarrolló un nanobiosensor que fue utilizado en la detección de plomo y níquel en soluciones acuosas de sales preparadas en el laboratorio, inicialmente se sintetizaron las nanopartículas de oro en fase acuosa usando el método coloidal el cual hace parte de los métodos bottom-up, usando como reactivo metálico el ácido tetracloroáurico trihidratado ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) y como agente reductor se utilizó el quitosán nanopartículas fueron funcionalizadas con ésta misma biomolécula. La formación de nanopartículas metálicas fue confirmada mediante la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS) y microscopía electrónica de barrido (SEM) la primera permitió analizar el tamaño de las nanopartículas sintetizadas; a su vez la segunda técnica se empleó para el estudio de los demás aspectos morfológicos de las mismas.

La caracterización de las nanopartículas se realizó por medio de absorción UV-visible y para comprobar la función del nanosensor frente a soluciones acuosas de sales de plomo y níquel se usaron técnicas colorimétricas, donde la variación del color inicial de la solución del nanosensor indicó la detección del metal por parte de éste, así como un cambio generado en el espectro de las AuNPs.

ABSTRACT

In the present work a nanobiosensor was developed to be used in the detection of lead and nickel in aqueous solutions of laboratory prepared salts initially the gold nanoparticles were synthesized in aqueous phase using the colloidal method which is part of the bottom-up methods, using tetrachloroauric acid trihydrate as the metallic reagent ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) and chitosan was used as reducing agent, these nanoparticles were functionalized with this same biomolecule. The formation of metallic nanoparticles was confirmed by the Dynamic Light Dispersion technique (DLS) and Scanning Electron Microscopy (SEM) the first one allowed to analyse the size of the synthesized nanoparticles; Simultaneously, the second technique was used to study the other morphological aspects of the itself.

The characterization of the nanoparticles was carried out by means of UV-visible absorption and to check the function of the nanosensor against aqueous solutions of lead and nickel salts, colorimetric techniques were used, where the initial color variation of the nanosensor solution indicated the detection of metal by itself, as well as a change generated in the AuNPs spectrum.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad existe una gran preocupación por el deterioro que se le está ocasionando al medio ambiente el cual se debe en gran parte a las actividades realizadas por el ser humano todas estas actividades buscan el mejoramiento de la calidad de vida.

Gran parte de estas actividades surgen inicialmente de la búsqueda de nuevos materiales y compuestos que puedan satisfacer las necesidades y gustos de la población mundial en diferentes industrias se realizan procesos fisicoquímicos los cuales tienen como fin la creación y síntesis de nuevos compuestos, para dicho fin se utilizan como materias primas químicos y materiales que en muchos casos son altamente tóxicos y que además contaminan el medio ambiente como consecuencias de dichos procesos se generan gran cantidad de desechos los cuales generalmente van a parar a los ríos, suelos y a la atmosfera.

La mayoría de los residuos generados en los procesos industriales son compuestos químicos que en su mayoría están conformados por metales pesados entre los que se encuentran (cromo, mercurio, cobre, níquel, cadmio, plomo entre otros) , los cuales son altamente nocivos y tóxicos para el ser humano, atributo que ha desencadenado una gran preocupación en la población a nivel mundial, debido a que su toxicidad excede la totalidad de los residuos radiactivos y orgánicos, además son los causantes de una gran cantidad de enfermedades [1].

Debido a la alta toxicidad de los metales pesados, la agencia de protección ambiental de los EEUU (US EPA) los ha incluido en la lista de contaminantes prioritarios (US EPA). Entre los metales de gran interés por su incidencia en enfermedades se encuentran el níquel, al que se le considera como uno de los factores causantes de enfermedades respiratorias, incremento en la aparición de tumores malignos y aumento en tasas de mortalidad por cáncer, además de enfermedades causadas en la piel. También se encuentra el plomo, al que se le atribuyen efectos neurológicos, la aparición de dos tipos de anemia, efectos renales y por afectar no solo la viabilidad del feto sino su desarrollo. Así mismo, está el cadmio que presenta propiedades cancerígenas [2, 3,4].

Los metales pesados están ocasionando un daño grave al medio ambiente y en especial a las fuentes hídricas, que es el medio en el cual se encuentran en alto grado. En los últimos años se han desarrollado diversos estudios e investigaciones encaminadas a buscar técnicas de detección de estos metales en las aguas. De la química analítica han surgido varias metodologías para la detección de metales

pesados en aguas, las cuales son altamente costosas y utilizan en su mayoría una gran cantidad de compuestos químicos que originan un alto nivel de contaminación, de igual forma es importante destacar que la técnica espectroscópica denominada absorción atómica es una de las más utilizadas, para cuantificar metales [5].

Otras de las posibles soluciones son las aportadas por el campo de la Nanociencia y Nanotecnología, ramas que son relativamente nuevas y que estudian la materia a nivel nanométrico, con las cuales se han trabajado en la detección de metales pesados en aguas. Dichas técnicas ofrecen resultados rápidos, igualmente sus análisis no implican procedimientos complicados y largos para llegar al resultado esperado [6,7].

Por lo anterior, en este proyecto se desarrolló un nanosensor basado en nanopartículas de oro, las cuales fueron funcionalizadas con una biomolécula como el quitosán, este realizó de una forma rápida y sencilla la detección de metales pesados como el plomo y níquel en matrices de agua, lo cual generó una nueva forma de cualificar metales y lo convierte en un aporte a las técnicas analíticas.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 NANOTECNOLOGÍA

La Nanotecnología es un área interdisciplinar que estudia las diferentes estructuras cuyo diámetro oscila dentro de la escala nanométrica y sus aplicaciones, el prefijo nano hace referencia a la millonésima parte de un metro, a ésta escala se logra manipular la materia directamente a nivel atómico y molecular [8].

El padre de la Nanotecnología es el físico Richard Feynman quien en 1959 en la famosa conferencia titulada “There’s Plenty of Room at the Bottom” planteó la posibilidad de manipular la materia átomo por átomo, además de afirmar que si hasta el momento no se había logrado era por limitaciones netamente tecnológicas [9].

En la década de los 80’s la nanotecnología como resultado de la convergencia de varios avances tecnológicos y científicos entre los que se destacan la invención del microscopio de efecto túnel, el desarrollo de la microscopía de fuerza atómica y finalmente tal vez unos de los acontecimientos más importantes en esta rama de la ciencia, el descubrimiento del fullereno, todos estos acontecimientos marcaron el nacimiento de una nueva ciencia denominada Nanotecnología [10].

El término “Nanotecnología” fue acuñado por el Profesor Norio Taniguchi en 1974 en una conferencia sobre Ingeniería de la Producción. Según su definición la Nanotecnología era la tecnología necesaria para poder fabricar objetos o dispositivos (circuitos integrados, memorias de ordenador, dispositivos opto electrónicos, etc.) con una precisión del orden de 1 nm [11].

1.2 NANOPARTICULAS (NPs)

En el caso específico de las nanopartículas, que constituyen uno de los nanomateriales más significativos que forman parte de la propuesta nanotecnológica, la búsqueda de una definición se orienta desde las novedosas propiedades que exhiben estas entidades por pertenecer a una escala por debajo de los 100 nm [53]. Exhiben grandes ventajas relacionadas con su tamaño como la relación superficie/volumen, así como sus propiedades electrónicas y magnéticas, entre otras. Con el fin de que permanezcan aisladas sin aglomerarse, se recubren de una capa protectora de materiales orgánicos o inorgánicos. Las finalidades de este recubrimiento son diversas como su estabilización, hacerlas

biocompatibles o poder ser funcionalizadas con grupos funcionales específicos (-COOH, -NH₂), con enzimas, anticuerpos, aptámeros u otros compuestos [12].

1.3 NANOPARTICULAS METÁLICAS

Las nanopartículas metálicas son muy usadas para la detección de contaminantes orgánicos e inorgánicos, ya que estas pueden amplificar los campos electromagnéticos que inciden en ellas, debido a que cuando entran en contacto con la sustancia a medir, la señal del espectro se amplifica, lo que permite la detección [46,47] El sistema de detección óptica que involucra nanoestructuras es muy económico ya que no requieren de elaboración de dispositivos, la respuesta es rápida y es muy fácil de usar [48,49].

Las nanopartículas de metales nobles como oro, plata cobre etc., han despertado un gran interés debido a sus excepcionales cualidades entre las que se encuentran la formación única de una coloración, reactividad química, absorción de radiación y aquellas formadas por metales como el cobre y la plata presentan actividad antimicrobiana [20].

1.3.1 Nanopartículas de oro

Las nanopartículas metálicas que han llamado más la atención son las de oro pues son consideradas las más estables en comparación con los otros metales nobles. Entre sus propiedades destacan las ópticas y catalíticas que son dependientes del tamaño de partícula. Por ejemplo, como se observa en la Figura 1, el color de las soluciones de nanopartículas de oro puede ser rojo, rosado, violeta, morado, azul o amarillo según se incrementa el tamaño de partícula hasta la formación de aglomerados y agregados [54,55]



Figura 1. Variación de las propiedades ópticas de AuNPs con el tamaño

Actualmente se conocen diversas aplicaciones de las nanopartículas de oro entre las que se encuentran los usos en la medicina ya que pueden ser utilizadas en el tratamiento del cáncer, así como para elaborar nanoestructuras útiles para el transporte de fármacos y macromoléculas terapéuticas [21].

Otros de los campos donde se utilizan las nanopartículas de oro es el ambiental, ya que éstas han sido utilizadas en la detección de metales pesados en aguas, ofreciendo buenos resultados [30]. Ésta tecnología presenta un gran potencial ya que puede ser utilizada en aplicaciones reales como en la medición de la contaminación en el mar. La detección óptica se basa en el cambio de color de las nanopartículas de oro funcionalizadas al atrapar el metal contaminante, dicha técnica es sencilla y ofrece resultados rápidos y confiables. Igualmente, hay varios campos a los cuales se podrían extender las técnicas de detección de metales tales como en aguas de residuos industriales, o a nivel clínico (detección de metales en sangre), o el alimentario.

El tamaño, distribución y la forma de nanopartículas metálicas depende de algunos parámetros importantes, tales como el método de síntesis, agente reductor empleado, así como el pH y temperatura de la síntesis [13]. También se conocen estudios que indican que el diámetro y la distribución de tamaños de las NPs son directamente proporcionales [14].

La velocidad en que son mezclados los reactivos precursores de las NPs son igualmente factores decisivos en el tamaño de las nanoestructuras, lo mismo que el pH usado en la reacción es determinante para el ensamblaje de las NPs ya que potenciales de hidrógeno por debajo de 7 generan cargas positivas lo cual mantiene estable el potencial electrocinético de la solución coloidal favoreciendo el crecimiento de las nanopartículas, ya que mantiene la carga positiva en la capa de estas manteniéndolas estables. De la misma forma, la temperatura de síntesis es fundamental en el tamaño y forma de las nanopartículas [15, 16,17].

Dentro de las síntesis de nanopartículas podemos encontrar varias clasificaciones, está la basada de acuerdo al medio o fase a partir del cual se efectúa la síntesis, además existen tres metodologías para dicho fin, los métodos físicos, químicos y actualmente se han desarrollado nuevos métodos como es el caso de los biológicos [18].

1.4 SÍNTESIS DE NANOPARTICULAS

1.4.1 Síntesis de nanopartículas en microemulsión

Las nanopartículas obtenidas pueden ser de diferente composición y tamaño. Por medio de la variación de algunos parámetros empleados en el proceso, se puede variar la estructura superficial de la NP, así como su tamaño, que oscila entre 1-50 nm de acuerdo al surfactante empleado. Dentro de estas NPs se pueden encontrar de Pt, Pd, Ru, Cu, Ag y SiO₂ entre otros.

La síntesis se logra al mezclar volúmenes iguales de las dos microemulsiones que tienen una misma relación molar. La cantidad de surfactante representa 16.54 % del volumen de la misma, ésta contiene la solución acuosa del precursor metálico la otra una solución acuosa reductora. Después de que la reducción se complete, se agrega acetona a la solución para provocar la separación de fases y la precipitación de las nanopartículas. El precipitado se enjuaga varias veces con acetona y agua destilada, y luego se centrifuga por algunos minutos para eliminar la mayor parte de surfactante. Posteriormente las partículas se ponen en un volumen pequeño de agua destilada como una suspensión.

1.4.2 Síntesis de nanopartículas en sistemas coloidales

Mediante ésta técnica se pueden obtener NPs de diferentes formas, de acuerdo a las condiciones de síntesis usada.

Este método consiste en disolver una sal del precursor metálico o del óxido a preparar, un reductor y un estabilizante en una fase continua o dispersante (un líquido en este caso). Este último puede jugar el papel de reductor, de estabilizante o ambos. En principio el tamaño promedio, la distribución de tamaños y la forma o morfología de las nanopartículas pueden ser controlados variando la concentración de los reactantes, del reductor y del estabilizante, así como la naturaleza del medio dispersante.

De igual forma, el tamaño de estas nanoestructuras que puede variar entre 5-50 nm, se puede controlar de acuerdo al agente protector empleado. Cabe destacar que mediante este tipo de síntesis se pueden obtener igualmente nanofilamentos, empleando agentes coloidales y reductores débiles, a partir de nanopartículas que actúan como núcleos de crecimiento.

1.4.3 Síntesis de nanopartículas en fase acuosa

En esta técnica se parte de las disoluciones precursoras de las nanoestructuras y agentes reductores fuertes como el borohidruro de sodio que cumple la función de dar origen a las nanopartículas reduciendo las sales precursoras, pero además protege y estabiliza las nanopartículas ya sintetizadas. Es importante destacar que de la concentración del agente reductor depende el tamaño de las NPs, que en general oscilan entre 50-500 nm.

Así mismo, dentro de la síntesis de nanopartículas se encuentra otra clasificación basada en las aproximaciones “*top-down*” y “*bottom-up*” o de “arriba hacia abajo” y de “abajo hacia arriba”. Dentro de la primera aproximación, como su nombre lo indica, se basa en partir de sólidos de grandes proporciones, los cuales mediante procesos físicos conduce a la obtención de proporciones más pequeñas [18].

Las siguientes son las técnicas que utilizan como fundamento el “*top-down*”.

- a) **La evaporación térmica:** Se basa en el calentamiento hasta la evaporación del material empleado para la síntesis. En esta técnica es fundamental controlar las condiciones usadas en el crecimiento de las NPs, con el fin de evitar modificaciones de la forma de la capa depositada.
- b) **La implantación de iones:** Por éste método se pueden implantar iones de determinado material en un sólido, lo cual genera modificaciones de morfología, así como variación en las propiedades físicas y químicas. Esta técnica permite determinar en cierta forma las dimensiones de las NPs, ya que controla la dosis de iones depositados, que lleva a la formación de las nanopartículas metálicas.
- c) **Deposición química en fase de vapor:** Usada igualmente para la obtención de varios tipos de nanoestructuras como nanotubos de carbono, nanohilos y nanofilamentos, entre otros. Como su nombre lo indica se basa en la deposición sobre un sólido, del producto de la descomposición de un compuesto volátil que contiene el agente precursor de las NPs, este proceso se lleva a cabo en vacío, dentro del interior de un reactor.
- d) **La molienda:** Es de los métodos más empleados para la obtención de nanopartículas, refinando el tamaño de partículas grandes y/o aglomeradas. A pesar de obtenerse altas producciones de NPs, estas nanoestructuras presentan un alto grado de contaminación.

- e) La preparación de clústers gaseosos:** En esta técnica se parte del uso de láseres a alta potencia, empleados con el fin de originar vapores metálicos que son depositados sobre un sustrato. Las condiciones necesarias son de ultra-alto vacío. Dentro de la aproximación “*bottom-up*” para síntesis de nanopartículas, los métodos más usados implican procedimientos químicos y son [18].
- a) El método coloidal:** consiste en reducir el metal presente en la sal precursora y llevarlo hasta un estado de oxidación cero utilizando un agente reductor que pueda generar el coloide y posteriormente el crecimiento de nanopartículas
- b) Reducción fotoquímica y radioquímica:** La reducción fotoquímica se basa en la reducción de sales metálicas por radiación de luz ultravioleta visible, por medio de este método se obtienen nanopartículas metálicas de plata, oro, platino, paladio y cobalto, entre otros; igualmente puede incorporar solventes orgánicos o sales inorgánicas metálicas a altas concentraciones. La reducción radioquímica por otra parte se basa en la irradiación con rayos x puede hacer que el solvente o el soluto trabajen como reductor.
- c) Irradiación con microondas:** Es un método rápido y efectivo, ya que permite temperatura, lo que proporciona un medio más homogéneo para el crecimiento de las NPs metálicas. Las nanopartículas obtenidas presentan muy baja dispersión de tamaño, aunque requiere un control preciso en el tamaño y morfología como en las otras técnicas. Comparado con otros métodos convencionales la síntesis por microondas tiene como ventaja que es una reacción que se realiza en poco tiempo y produce pequeñas partículas con una baja distribución de tamaño y alta pureza.
- d) Utilización de dendrímeros:** Los dendrímeros con varios grupos funcionales terminales han sido usados para la síntesis de nanopartículas monometálicas y bimetálicas. Con dendrímeros se han sinterizado nanopartículas de oro de 1-3 nm. De igual forma, han sido usados para la síntesis de nanopartículas de platino y paladio con tamaños entre 1 y 2 nm incorporadas en dendrímeros poli(amidoaminas) funcionalizadas con grupos amino. Los dendrímeros han sido activamente utilizados para la síntesis de nanopartículas bimetálicas [22, 23, 24].

En la actualidad han surgido nuevas metodologías las cuales son utilizadas con la finalidad de sintetizar nanopartículas metálicas mediante el uso de biomoléculas, razón por la cual se han denominado métodos biológicos, los cuales han surgido debido a la creciente necesidad por utilizar metodologías de síntesis de nanomateriales menos contaminantes, que al mismo tiempo impliquen menos costos y que sean igual de efectivos.

1.5 SINTESIS VERDE DE NANOPARTÍCULAS

La preocupación por el deterioro ambiental ha llevado a la generación de técnicas de síntesis verde de nanopartículas metálicas. En este tipo de síntesis se busca hacer la reducción de sales precursoras utilizando agentes reductores y estabilizadores los cuales son provenientes de fuentes naturales. Existen diversos materiales empleados como componente principal de la matriz que formará las nanopartículas biodegradables, dentro de éstos se incluyen fosfolípidos y ácidos grasos, proteínas (gelatina, albúmina) y polímeros, naturales (dextrano, quitosán), semisintéticos (derivados de celulosa) o sintética poli(acrilatos), poli(anhídridos), poli(acrilamidas) y poli(ésteres) [56,57].

1.5.1 Quitosán en la síntesis verde de nanopartículas de oro

El quitosán es el segundo biopolímero más abundante en la naturaleza, corresponde a un polisacárido transformado que se obtiene por la desacetilación de quitina natural (N-acetilglucosamina), constituyente del caparazón de los crustáceos y de muchas paredes celulares [58]. Este polímero ha adquirido mucha atención, porque es un polisacárido con excelentes propiedades, como biocompatibilidad, biodegradabilidad, poca toxicidad, además de poseer propiedades de adsorción, resultando en muchos casos sintetizado como microesferas, hidrogeles, películas, entre otras [3].

El quitosán fue descubierto por Rouget en 1859, quien encontró que al tratar quitina con una solución caliente de hidróxido de potasio se obtiene un producto soluble en ácidos orgánicos. Esta “quitina modificada”, como él la llamó, se tornaba de color violeta en soluciones diluidas de yoduro y ácido, mientras la quitina era verde. Más tarde, en 1894, fue estudiada por Hoppe-Seyler quién la denominó “quitosán” (también se conoce como quitosano en algunos lugares, chitosán en inglés). En el siguiente esquema se aprecia los pasos elementales en la obtención del quitosán.

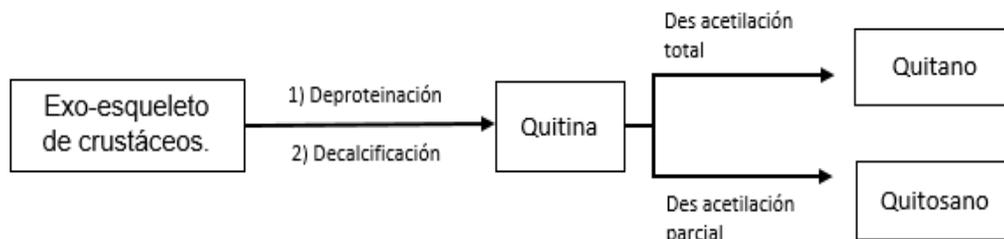


Figura 2. Obtención de quitosán a partir del exoesqueleto de los crustáceos

La desacetilación completa de la quitina produce un material totalmente soluble en medio ácido conocido como quitano; sin embargo, cuando la desacetilación del material de partida es incompleta se crea una mezcla de cadenas que tienen distintas proporciones de unidades $\beta(1-4)$ - 2-acetamido-2-desoxi-D-glucosa y $\beta(1-4)$ -2-amino-2-desoxi-D-glucosa, cuya relación depende de las condiciones de reacción y que, obviamente, genera materiales con distintas propiedades denominados quitosanos. La diferencia en las propiedades de estos materiales puede llegar a ser notable, como por ejemplo la distinta solubilidad en medio acuoso que pueden llegar a tener. Las estructuras químicas de la quitina y el quitosán se muestran a continuación

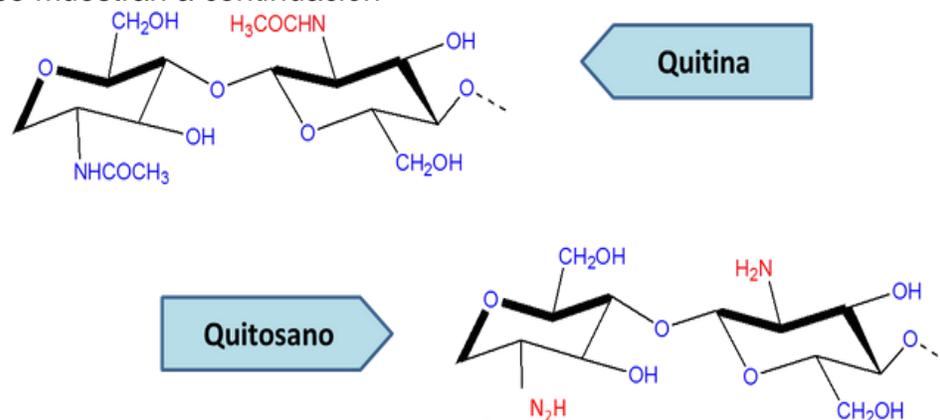


Figura 3. Estructuras químicas de la quitina y quitosán [66]

La presencia de grupos aminos en la cadena polimérica ha hecho del quitosán uno de los materiales más versátiles que se estudian desde hace ya algún tiempo, por la posibilidad de realizar una amplia variedad de modificaciones, tales como la reacciones de anclaje de enzimas, reacciones de injerto, obtención de películas entrecruzadas, etc., de las cuales se obtienen materiales con propiedades

adecuadas para aplicaciones inmediatas y futuras en biotecnología, biomedicina, agricultura, ingeniería ambiental etc [59].

El quitosán actúa tanto como agente reductor y como agente estabilizador de la superficie de otras nanopartículas metálicas como Ag, Pd, Pt y Fe_3O_4 y evita su agregación. La estabilidad se logra porque los grupos amino del biopolímero se adsorben a las superficies de los metales mediante fisorción [62]. Respecto a las nanopartículas de oro con quitosán, Huang y Yang han reportado que la concentración del biopolímero influye en el tamaño y forma de partícula, mientras que su peso molecular afecta la distribución de tamaños [60].

La síntesis de nanopartículas de oro involucra una reacción redox. Sin embargo, el mecanismo de reacción con quitosán todavía no se conoce ya que existen dos grupos reductores distintos: $-\text{CH}_2\text{OH}$ (grupo hidroxilo) y $-\text{CHO}$ (grupo aldehído) [61]. La Figura 4 muestra el esquema que representa los pasos de síntesis, propuesto por Sun y colaboradores, en el cual la degradación del quitosán permite que los grupos aldehídos en los extremos de la cadena se oxiden y reduzcan a los cationes metálicos a átomos neutros [63].

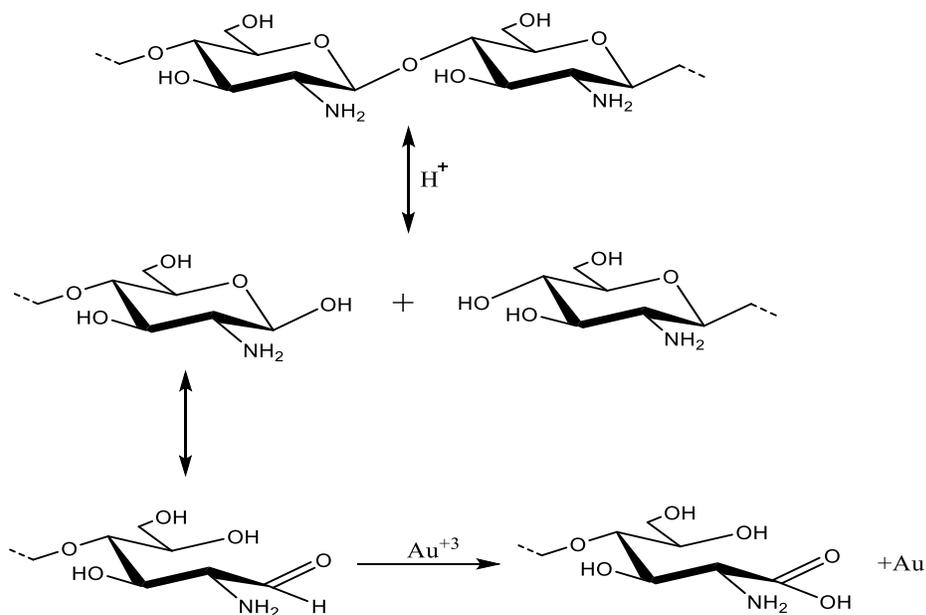


Figura 4. Quitosán como agente reductor: a) Hidrólisis en medio ácido del quitosán a glucosamina, b) Equilibrio de glucosamina a cadena abierta y c) Oxidación del grupo aldehído a ácido carboxílico [63].

1.6 CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS

La caracterización de las nanopartículas es de vital importancia ya que, es la clave para hacer nuevos descubrimientos. En esta escala de tamaños, la observación se realiza con una sonda que puede consistir en fotones, electrones, neutrones, átomos, iones o incluso una punta atómicamente “afilada”. Para los nanomateriales, la sonda a menudo tiene diferentes frecuencias, que van desde los rayos gamma a los infrarrojos o más allá, en el caso de los fotones, y hasta energías relativistas en el caso de las partículas. La información resultante puede ser procesada como imágenes, espectros, etc. que revelan los detalles topográficos, geométricos, estructurales, químicos o físicos del material. Una amplia gama de técnicas se encuentra disponible para la caracterización de materiales, que puede ser usado para estudiar los nanomateriales. La técnica más utilizada en la caracterización de las nanopartículas, el tamaño y forma de las mismas es la microscopia de barrido electrónico (SEM), esta técnica produce imágenes con electrones, para lograr dicho fin el equipo cuenta con un dispositivo que genera un haz de electrones para iluminar la muestra y con diferentes detectores determinar características de la imagen como la forma, textura y composición química [19].

La espectroscopia de UV-Vis permite saber si el proceso ha concluido con la formación de las nanopartículas, ya que la aparición de un pico característico en el espectro corroborara la existencia de la nanopartícula metálica, ya que el metal del cual está formada la nanopartícula absorberá en dicha región, por tanto, elucidara su composición la aparición de un pico característico de cada metal [32].

1.6.1 Banda de plasmones de superficie localizados

Las nanopartículas de Au en medio acuoso presentan variedad de colores debido a una propiedad física denominada resonancia de plasmones de superficie localizados. Esta propiedad se define como la oscilación colectiva de los electrones libres de la banda de conducción en la superficie de la nanopartícula al absorber radiación electromagnética de una determinada energía [64].

En general, las AuNPs esféricas muestran una sola banda de absorción alrededor de 520 nm, una banda adicional entre 600-900 nm indica la presencia de nanopartículas no esféricas. Por ejemplo, las nanobarras de oro poseen dos bandas de absorción, la banda cercana a 520 nm corresponde al modo de plasmón transversal y otra banda de mayor intensidad en la región infrarroja entre 700 nm y 1000 nm señala el modo de plasmón longitudinal [65].

En la Figura 5, se presenta el espectro UV-Vis de AuNPs donde se pueden observar la banda de absorción del plasmón comprendido entre los 500 a 535 nm.

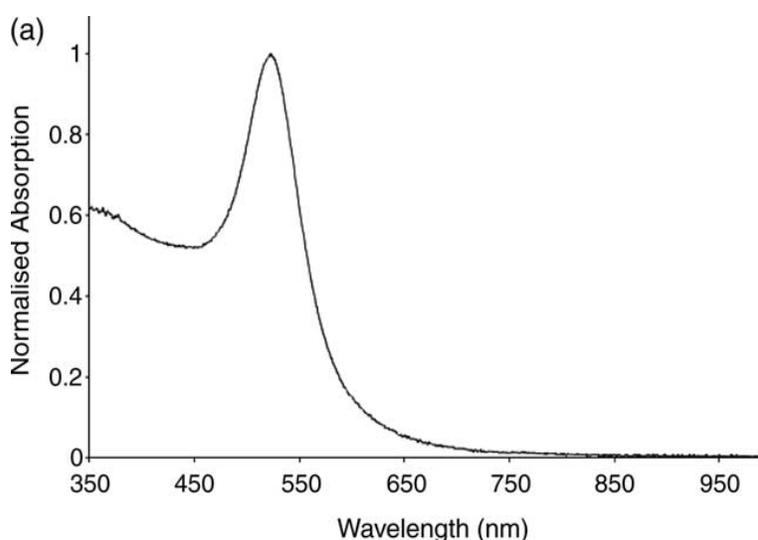


Figura 5. Banda de absorción del plasmón de las AuNPs [14]

1.7 FUNCIONALIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS

Muy pocas aplicaciones se pueden obtener a partir de suspensiones coloidales de las nanopartículas inmediatamente después de su síntesis, por lo que la mayoría de las aplicaciones requieren de procesos posteriores para la utilización del nanomaterial. Casi todas las aplicaciones requieren que la interacción entre las nanopartículas y el medio anfitrión, sustratos o moléculas, sean controladas. Este control es obtenido mediante la llamada funcionalización, la cual consiste en incorporar en la superficie de las nanopartículas moléculas con grupos funcionales específicos. Estos grupos funcionales pueden ser elegidos sólo para asegurar la estabilidad del coloide o bien para permitir su unión a diferentes sitios específicos del medio anfitrión [40].

El objetivo de la funcionalización es cubrir la superficie de las nanopartículas con los grupos funcionales que son necesarios para su posterior procesamiento, estos grupos pueden ser moléculas orgánicas o inorgánicas y en otras ocasiones biomoléculas, los más utilizados son aquellos que contienen como ligando por ejemplo $-COOH$, $-OH$, $-NH_2$, entre otros [41, 42].

También son importantes grupos funcionalizantes de las nanopartículas, las biomoléculas como es el caso de los péptidos, enzimas y moléculas provenientes de fuentes naturales.

En este trabajo se funcionalizaron las nanopartículas que cumplieran con su finalidad, la cual era la detección metales como el plomo y níquel en aguas, para dicho fin se debe utilizar un compuesto químico o biomoléculas denominadas grupos funcionalizantes como los anteriormente nombrados. En esta investigación se utilizó el quitosán él cual es un carbohidrato, perteneciente a los polisacáridos que proviene del caparazón de crustáceos como la gamba, este compuesto tiene propiedades únicas como biopolímero, especialmente debido a la presencia de grupos amino primarios, lo que permite que este compuesto sea utilizado inicialmente como una hipótesis sabiendo que posee características de agente quelante de iones metálicos en soluciones neutras [43,44].

2. METODOLOGÍA

2.1 SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE ORO (AuNPs)

2.1.1 Preparación de la solución de la sal metálica

Se preparó una solución acuosa 0.1 mM de ácido tetracloroáurico trihidratado ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) para la síntesis de las nanopartículas de oro.

2.1.2 Preparación de las soluciones reductoras de quitosán

Se prepararon soluciones de quitosán al 0,125 %, 0,25 %, 0,75 % y 1 % utilizando como solvente para solubilizar el quitosán una solución de ácido acético al 1 %.

2.1.3 Síntesis de las nanopartículas de oro

Las nanopartículas se sintetizaron siguiendo el método desarrollado por Turkevich y colaboradores [25]. Inicialmente cada una de las soluciones de quitosán fueron colocadas a calentamiento hasta ebullición, luego se le adicionaron cuidadosamente 100 μL de solución de la solución de ácido tetracloroáurico trihidratado en constante agitación, el calentamiento se mantuvo por 15 minutos hasta la formación de un color rojizo el cual indicó la formación del complejo AuNPs- quitosán, finalmente la solución de nanopartículas se guardó en un frasco ámbar y se mantuvo refrigerada a 4°C.

2.2 CARACTERIZACION DE LAS NANOPARTICULAS DE ORO

La formación de nanopartículas se comprobó por medio de la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS) y microscopía electrónica de barrido (SEM), la primera permitió analizar el tamaño de las nanopartículas sintetizadas; a su vez la segunda técnica se empleó para el estudio de los demás aspectos morfológicos de las AuNPs. El análisis espectral se usó para caracterizar las nanopartículas metálicas obtenidas en las diferentes condiciones de reacción, lo cual se obtuvo mediante espectroscopia UV-Visible.

2.3 FUNCIONALIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO

La funcionalización las AuNPs se realizó utilizando una solución de la biomolécula quitosán. Cuyo objetivo fue funcionalizar, estabilizar y recubrir las nanopartículas, además se utilizaron las propiedades quelantes de este polímero y junto a las

propiedades ópticas del oro poder detectar plomo y níquel [45]. Inicialmente el protocolo consistió en una preparación de una disolución del quitosán en ácido acético al 1% v/v a un pH de 2, la cual se le adicionó a la solución acuosa que contenía las nanopartículas. Finalmente, la mezcla se colocó durante 10 minutos en un baño de ultra sonido para realizar una limpieza de las nanopartículas, la funcionalización se corroboró al observar cambios en propiedades tanto de los precursores como las del grupo funcionalizante [52].

2.4 COMPORTAMIENTO DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO

Para la detección de metales pesados las AuNPs se expusieron a soluciones de cationes divalentes (Pb^{+2} y Ni^{+2}) durante periodos de 5 minutos con el fin de comprobar los cambios presentados en la coloración de la solución final, mirando que un cambio de coloración y formación de precipitados en la solución posiblemente se debiera a la quelación de las nanopartículas con los metales. El resultado también se corroboró por medio de un análisis por UV-Visible de acuerdo a la variación observada en el espectro. Ya que mediante el proceso de quelación se dieron cambios en el espectro de absorción de las AuNPs, lo que permitió la detección.

2.5 VALIDACIÓN DEL NANOSENSOR

2.5.1 Tiempo de análisis del nanosensor de AuNPs

Para determinar el tiempo de análisis a usar durante la detección de los metales Ni^{+2} y Pb^{+2} , se realizó una prueba inicial, para lo cual nanopartículas de AuNPs funcionalizadas se expusieron a soluciones divalentes de metales a diferentes concentraciones para cada metal a detectar durante diferentes intervalos de tiempo, inicialmente de un minuto hasta los 5 minutos, registrando la respuesta colorimétrica obtenida en cada caso.

2.5.2 Sensibilidad del nanosensor de AuNPs

La sensibilidad del nanosensor se evaluó mediante el registro de la respuesta colorimétrica del mismo al ser expuesta a las diferentes concentraciones de las sales, un mínimo de 10ppm y un máximo de 200ppm. La temperatura a la cual se realizó el análisis fue 20°C.

2.5.3 Selectividad del nanosensor de AuNPs

Para comprobar la selectividad del nanosensor, éste se usó en la detección de otros contaminantes que por literatura se sabe que están presentes en muestras de agua.

Por lo que pueden comportarse como interferentes. Lo esperado es que solo se evidencie respuesta colorimétrica en las soluciones con los metales a trabajar y no con las posibles interferencias.

Se prepararon estándares de soluciones acuosas de Co^{+2} y K^{+1} , de los cuales se tomaron 10 mL se adicionaron en un frasco, seguidamente se le adicionaron 5 gotas de la solución de nanopartículas de oro sintetizadas anteriormente, finalmente se observó el comportamiento del nanosensor frente a este tipo de matrices.

2.5.4 Estabilidad del nanosensor de AuNPs

Con el fin de comprobar la estabilidad del dispositivo biosensor, se almacenó a temperatura ambiente y otro a 4°C en frasco ámbar. Las pruebas se realizaron por pasado 10 días para observar el comportamiento después este tiempo. El comportamiento óptico del nanosensor se comprobó a las dos temperaturas de almacenaje, con el fin de determinar las condiciones óptimas de almacenaje del mismo.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE ORO (AuNPs)

En la figura 6 se puede apreciar la solución acuosa del ácido tetracloroáurico trihidratado antes del proceso de síntesis donde se observa que esta posee una coloración amarilla típica de las sales ácidas de oro.



Figura 6. Solución acuosa del ácido tetracloroáurico trihidratado

En la figura 7 se muestran las soluciones coloidales de oro a tamaño nanométrico (AuNPs) después del proceso de síntesis, se realizaron cuatro síntesis utilizando en cada una de ellas diferente concentración de quitosán 0,125%, 0,25% 0,75% y 1%.



Figura 7. Síntesis de AuNPs a diferentes concentraciones de quitosán

En la figura 7 se puede observar que la coloración de la solución de las nanopartículas depende de la concentración del agente reductor en este caso el quitosán, cabe destacar que las AuNPs en soluciones acuosas presentan diferentes tonalidades de color, cualidad que depende del tamaño de partícula, pureza y de las propiedades ópticas que posee este metal, como se evidencia en las figuras mostradas ya que la tonalidad del color de las soluciones se incrementa a medida que se aumenta la concentración del quitosán.

De acuerdo con la literatura, las nanopartículas de oro en estado acuoso, presentan coloraciones que van desde el color azul hasta el rojo intenso, inicialmente se puede afirmar que el proceso de síntesis fue exitoso, es decir la reacción de reducción química de sal precursora de oro se llevó a cabalidad, asimismo, se puede partir de la hipótesis que se obtuvieron partículas de oro de tamaño nanométrico, por la coloración de las soluciones obtenidas.

También es importante destacar que condiciones como el pH y la temperatura son importantes en la síntesis de nanopartículas, inicialmente la medida del potencial de hidrogeno requiere que este en un valor de 2 ya que estas condiciones permiten que el agente reductor se solubilice, además la reacción de reducción química se realiza en medio ácido por tanto es necesario que el pH de la solución sea menor a 7.

La otra propiedad importante en la síntesis de nanopartículas es la temperatura ya que a medida que se incrementa el calor proporcionado en el proceso de síntesis, la nucleación de las nanopartículas se incrementa disminuyendo el tamaño de las AuNPs, resultado que se busca obtener, ya que se desean obtener partículas que presenten un bajo diámetro nanométrico.

De acuerdo a los anteriores argumentos y observando la coloración de la solución obtenido después del proceso de síntesis se puede afirmar que la síntesis fue exitosa y que en su totalidad se cumplieron con todas las condiciones de síntesis para obtener nanopartículas de oro de excelente calidad y de un alto grado de pureza.

3.2 CARACTERIZACIÓN DE LAS NANAPARTICULAS DE ORO

3.2.1 Caracterización de las AuNPs por UV –visible

Todo proceso de síntesis química requiere la caracterización de los compuestos producidos, ya que es de vital importancia conocer la estructura y composición química de producto, para tal fin existen diversas técnicas tanto analíticas como

instrumentales, cada una de ellas permite en algunos casos conocer la estructura y otras permiten conocer químicamente el grado de pureza y concentración del analito. En este caso era necesario comprobar la eficiencia del proceso de síntesis y determinar el resultado final de la misma, por lo tanto, la solución de AuNPs cuya concentración de reductor fue de 1% fue analizada por UV-visible para observar la banda de absorción de resonancia del plasmón de superficie (SPR), pico de resonancia que depende del tamaño de la nanopartícula y es característica para cada metal. A continuación, en la figura 8 se observa el espectro de absorción en la región ultravioleta visible de las nanopartículas de oro sintetizadas.

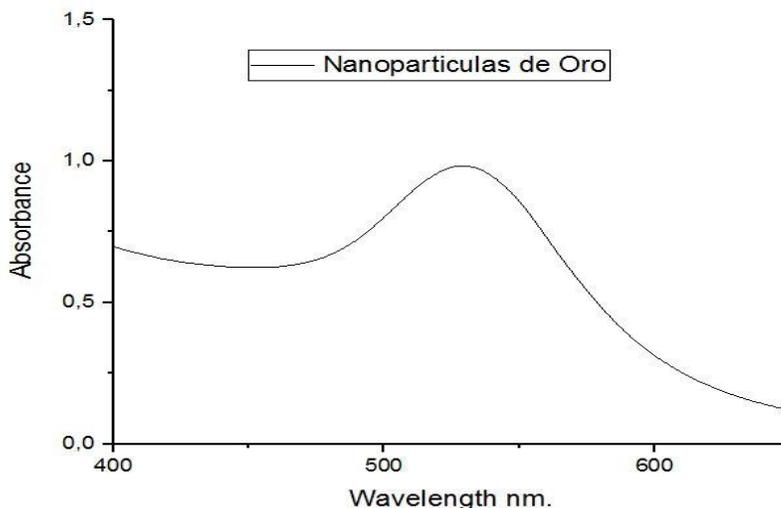


Figura 8. Espectro de absorción UV-Visible de AuNPs

En el espectro se evidencia la formación de una banda simétrica de absorción alrededor de los 528 nm, esta banda corresponde a la resonancia del plasmón para nanopartículas de Au, la cual hace referencia a la absorción de luz de pequeñas partículas metálicas y que es asociado con un fenómeno de excitación coherente y colectiva de los electrones “libres” en la banda de conducción, produciéndose una oscilación en fase que se conoce como resonancia del plasmón superficial (SPR). Viéndolo desde un punto de vista microscópico, lo que ocurre es que el campo electromagnético alternante de la luz incidente interacciona con las nanopartículas, induciendo una polarización en la superficie de la misma, debida al desplazamiento de los electrones libres con respecto a la red de cationes. La energía de esta resonancia del plasmón superficial depende tanto de la densidad de electrones libres como del medio dieléctrico que rodea a la partícula, situándose en el rango de la luz visible para metales nobles según la literatura las partículas de oro a tamaño nanométrico presentan esta banda en un

intervalo que va desde 520 a 530 nm, de acuerdo con esta información se puede decir que el proceso de síntesis fue eficaz y también que la solución analizada por esta técnica está conformada por nanopartículas de oro en estado coloidal, corroborando los resultados de la síntesis.

3.2.2 Dispersión dinámica de luz (DLS)

A continuación, se muestra en la figura 9 los resultados obtenidos por la técnica de dispersión dinámica de luz.

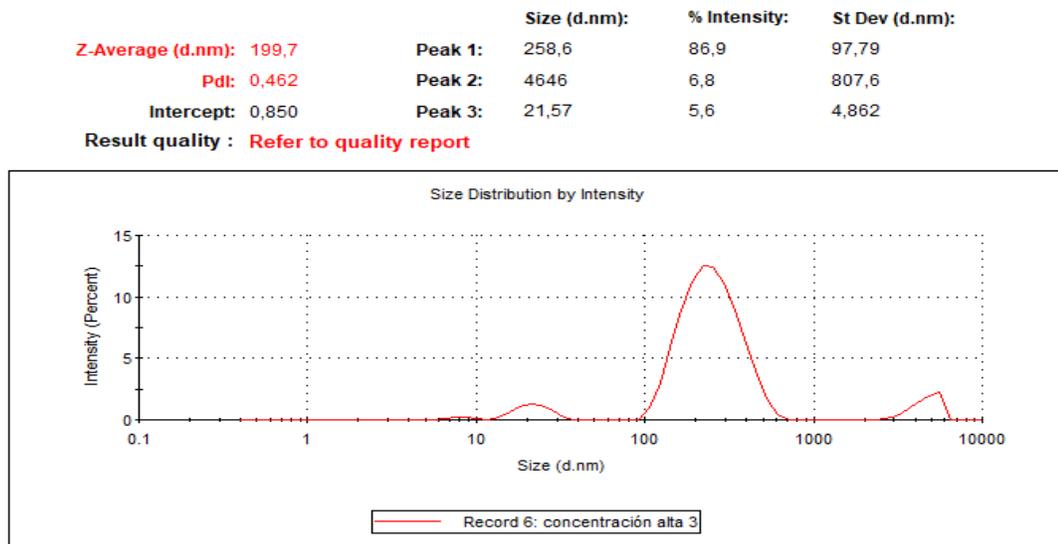


Figura 9. Imagen obtenida de análisis por DLS

Se puede apreciar el resultado del análisis por DLS, donde se evidencia que existe la formación inicialmente de nanopartículas y que su tamaño varía encontrando que la mayoría de ellas se encuentran en el rango de los 260 nm y que una pequeña parte de las AuNPs se encuentran por debajo de los 100 nm, es importante resaltar que los agentes funcionalizantes como el quitosán y algunos recubrimientos generan un aumento en el diámetro de las AuNPs y también la fase acuosa hacen que el radio hidrodinámico crezca. En la figura además se puede observar que el índice de dispersión está en 0,462 lo que significa que las nanopartículas se encuentran un poco aglomeradas ya que el valor ideal para este tipo de mediciones debe ser igual o menor a 0.4, resultado que genera que las nanopartículas presenten un mayor diámetro, aunque es importante destacar que la mayoría de las AuNPs formadas presenta una buena dispersión.

3.2.3 Microscopia electrónica de barrido (SEM)

A continuación, se presentan las imágenes obtenidas para el análisis de microscopia de barrido electrónico (SEM).

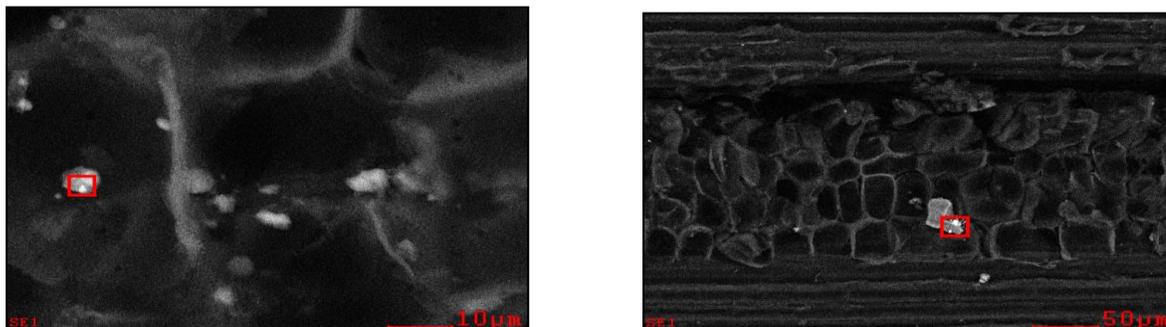


Figura 10. Imágenes de las AuNPs en 1% de quitosán obtenidas por análisis de SEM

Como se puede observar en las imágenes de microscopia de barrido electrónico las nanopartículas aparecen soportadas sobre la fibra de caña flecha ya que fue imposible soportarlas sobre cuarzo debido a que la muestra se encontraba en estado líquido, mientras que al utilizar la fibra de caña flecha la cual presenta poros, las nanopartículas se depositaron en estos haciendo más fácil su detección toma de imágenes. De acuerdo a las imágenes de la microscopia SEM se comprobó gráficamente la existencia de las AuNPs, inicialmente se puede observar que se encuentran dispersas y otras formando algunos aglomerados soportando los resultados de DLS. La morfología de las nanopartículas se aprecia también en la imagen donde se logra evidenciar que algunas presentan forma esférica y otras se aglomeran dando origen a una forma amorfa, en su mayoría se evidencia esta tendencia, efecto que posiblemente se deba a la funcionalización de las AuNPs y el estado acuoso en el que se encuentran las partículas.

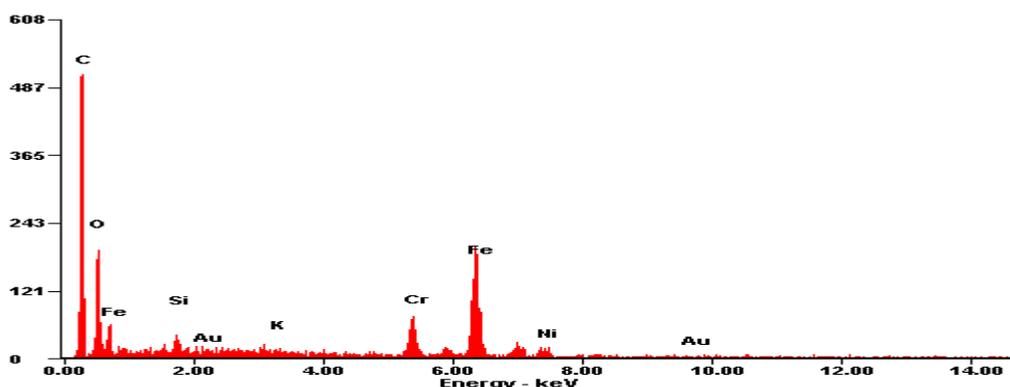


Figura 11. Abundancia relativa de los elementos en la muestra analizada por SEM

Como se puede observar en la figura 11 la cual corresponde a la abundancia relativa de los analitos presentes en la muestra analizada de nanopartículas de oro, según lo mostrado en la imagen se aprecia que aparecen elementos como el carbono con una gran abundancia resultado se debe a la presencia de este elemento en la fibra natural sobre las cuales fueron soportadas las AuNPs, también se evidencia la presencia de otros metales los cuales posiblemente provengan de la fibra y lo más importante de esta imagen es que revela la presencia de oro en una baja abundancia lo que se debe a que las nanopartículas se encontraban dispersas y en baja concentración, lo destacable de la figura 11 es que se logra evidenciar la presencia de este metal en la muestra analizada.

3.3 FUNCIONALIZACIÓN DE LAS NANOPARTICULAS DE ORO

La funcionalización de las nanopartículas de oro se realizó utilizando un ligando de tipo orgánico, en este caso el quitosán cuyo compuesto presenta en su estructura molecular grupos amino $-NH_2$ los cuales interaccionan electrostáticamente con la gran superficie del oro generando un enlace covalente entre el metal y el ligando, dicho enlace se presenta entre los electrones del oro y los aportados por el nitrógeno, con la funcionalización se logró también recubrir la superficie de las AuNPs permitiendo la estabilización de las mismas.

3.4 VALIDACIÓN DEL NANOSENSOR

3.4.1. Tiempo de análisis

Siempre que se produce un nanosensor es importante determinar cuál es el tiempo promedio de respuesta frente a los cationes analizar, ya que lo que se busca detectar el analito en el menor tiempo posible.

Por lo tanto, se realizaron medida de tiempo de respuesta para cuatro diferentes concentraciones de las sales con el fin de determinar el tiempo de respuesta.

A continuación, se presentan en la tabla 1 los resultados obtenidos para el tiempo de detección para soluciones acuosas de Pb^{+2} .

Concentración Pb^{+2} (mg/L)	Tiempo de respuesta (S)
10	Negativo
50	Negativo
100	90
200	60

Tabla 1. Tiempos de detección para Pb^{+2}

En la tabla 2 se encuentran tabulados los resultados obtenidos para el tiempo de detección para soluciones acuosas de Ni⁺².

Concentración Ni ⁺² (mg/L)	Tiempo de respuesta (S)
10	Negativo
50	Negativo
100	200
200	90

Tabla 2. Tiempos de detección para Ni⁺²

De acuerdo a los resultados obtenidos para el análisis de tiempos de detección reportados en la tabla 1 los cuales se realizaron para la solución acuosa de Pb⁺² con nanopartículas de oro se puede decir que los resultados se logran observar rápidamente ya que solo para muestras donde el analito se encuentra diluido el tiempo de detección no supera los tres minutos y a medida que se aumenta la concentración del metal en la solución acuosa el tiempo de detección disminuye haciendo más rápido el análisis, la misma tendencia se logró evidenciar en los resultados obtenidos para la solución acuosa de Ni⁺² solo que aquí la diferencia radica en la cantidad de tiempo registrada para la detección donde los tiempos fueron superiores con respecto al Pb⁺².

También es importante destacar que los tiempos de análisis utilizando AuNPs como nanosensores son más cortos y rápidos que los que presentan otras técnicas analíticas como la absorción atómica donde el análisis de metales requiere demasiados materiales y equipos para obtener una respuesta ya sea cuantitativa o cualitativa, mientras que con este nanosensor solo basta con esperar unos minutos para observar la quelación de los metales por parte de las nanopartículas, arrojando un cambio de coloración en la solución de estudio.

3.4.2 Sensibilidad del nanosensor de AuNPs

Una de las condiciones más importantes cuando se desarrolla un sensor es determinar cuantitativamente cuál es la sensibilidad de medida del sensor frente a soluciones acuosas de los metales a detectar a diferentes concentraciones, donde se tiene una de baja, media y alta concentración.



Figura 12. Detección del nanosensor a diferentes concentraciones

Lo que se analiza según las imágenes mostradas, es que la detección se logra para soluciones que son superiores a 50 ppm como se puede observar en la figura 12, donde se ve claramente que para las medias y altas concentraciones los resultados son positivos ya que se observa un cambio de coloración con respecto a las soluciones acuosas de las sales sin la adición de AuNPs, además se logra evidenciar la formación de precipitados en soluciones de 100 y 200 ppm, los cuales posiblemente contengan los metales quelados por las AuNPs.

Por lo tanto, se puede decir que el nanosensor desarrollado funciona bien para soluciones con una alta concentración de metales a detectar y empieza a fallar cuando la concentración del analito empieza a disminuir, determinando que el límite de detección se encuentra en 100 ppm y concentraciones superiores a este valor.

Para corroborar la detección de metales pesados como el níquel y plomo con las nanopartículas de oro sintetizadas fue necesario realizar un análisis de la solución que contenía los metales y las nanopartículas por espectroscopía uv-visible para observar las modificaciones en el espectro de las AuNPs, a continuación, se presenta la figura 13 que relaciona la banda de absorción de las nanopartículas de oro (línea inferior) y la banda de las AuNPs mas solución acuosa de Pb^{+2} (línea superior)

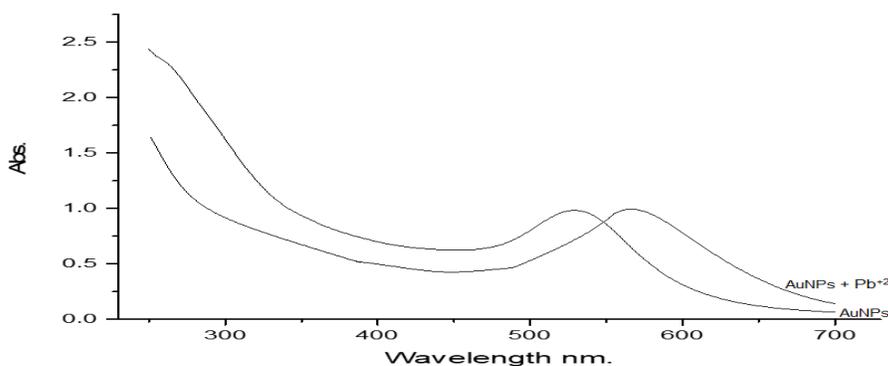


Figura13: Espectro de absorción de AuNPs mas solución de Pb^{+2}

Como se puede observar en la figura 13 que muestra la relación de espectros de las AuNPs solas y después de la detección, se puede inferir que después del proceso de detección la banda de adsorción de resonancia de plasmón sufre un leve corrimiento debido a proceso de quelación de los metales que realiza las AuNPs funcionalizadas con el quitosán, con este resultado se comprueba que efectivamente el proceso de detección fue exitoso.

2.5.5 Estabilidad del nanosensor de AuNPs

Esta prueba se realizó con el fin de conocer la estabilidad de las nanopartículas de oro después de pasados 10 días de la síntesis, con el fin de observar si las propiedades fisicoquímicas se perdían por efecto del tiempo de almacenaje, también con el objetivo de determinar las condiciones de temperatura adecuadas para un buen almacenaje.

A continuación, se presenta en la figura 14 los resultados obtenidos para las pruebas de estabilidad del nanosensor a temperatura ambiente.



Figura 14. Nanopartículas sintetizadas y almacenadas por 10 días a temperatura ambiente

En los resultados obtenidos muestran que las nanopartículas pasados los 10 días de almacenaje presentan excelentes condiciones, ya que se observa que la coloración inicial de la síntesis se mantiene, además se siguen manteniendo en solución sin formación de precipitados y coloides, para las nanopartículas que se encontraban a temperatura ambiente.

Como se puede observar en la figura 15 al adicionar las AuNPs a las soluciones acuosas que contienen plomo y níquel se evidencia la formación de una nueva coloración y la formación de un coloide el cual se depositó en el fondo del tubo, el resultado obtenido es similar al que se obtuvo al realizar las pruebas de detección con las nanopartículas sintetizadas el primer día, lo que confirma que las AuNPs pasados varios días siguen manteniendo las propiedades de detección.



Figura 15. Detección de metales utilizando las AuNPs pasados 10 días

Para las nanopartículas que se almacenaron a una temperatura de 4°C se obtuvieron resultados muy similares a los de detección a temperatura ambiente lo que indica que las AuNPs sintetizadas presentan una buena estabilidad tanto en temperaturas bajas como ambiente, lo que determina que las nanopartículas son muy estables y con el pasar del tiempo siguen manteniendo su función como detector químico ver figura 16



Figura. 16 Detección con AuNPs almacenadas a 4°C

2.6.2. Selectividad del nanosensor

En este análisis se buscaba observar colorimétricamente el comportamiento de las nanopartículas de oro sintetizadas con respecto otros posibles analitos que pueden estar haciendo parte de la muestra de aguas y pueden comportarse como interferencias, conociendo inicialmente por fuentes bibliográficas aquellas matrices que generalmente se presentan en muestras de aguas.

Las pruebas se realizaron para matrices diferentes a los metales a detectar, partiendo del conocimiento de la existencia de estas matrices en aguas según la información reportada por la literatura. Para el análisis se utilizaron soluciones acuosas de Co^{+2} y K^{+1} las cuales se colocaron a reaccionar con las nanopartículas de oro sintetizadas, por un tiempo de 5 minutos. A continuación, se presentan las figuras 14 y 15 las cuales permiten observar los resultados obtenidos para las pruebas de selectividad.



Figura 17. AuNPs mas solución acuosa de cloruro de cobalto

Como se puede apreciar en la figura 14 la solución inicial no cambio de coloración al adicionarles las gotas de la solución de AuNPs, tampoco se observó ninguna formación de precipitado o coloide, por lo tanto, se puede afirmar que en este caso el nanosensor no detecto los cationes de cobalto, es decir no existió ningún tipo de interacción fisicoquímica entre el sensor y el analito a detectar.



Figura 18. AuNPs mas solución acuosa de cloruro de potasio

Para la solución de potasio también ocurrió lo mismo, no presentó ningún cambio de coloración, ni tampoco existió formación de precipitado durante el tiempo que se dejó en reacción con la solución de nanopartículas de oro, por lo tanto, el nanosensor no presenta sensibilidad por este tipo de metal.

4. CONCLUSIONES

Durante el proceso de síntesis se logró evidenciar que las condiciones fisicoquímicas como el pH, la concentración y temperatura de síntesis son de vital importancia en la síntesis de AuNPs ya que estas definen condiciones de morfología y tamaño de las nanopartículas, de acuerdo a los resultados obtenidos las mejores condiciones de síntesis de nanopartículas de oro involucran temperaturas cercanas al punto de ebullición del agua, pH bajos y concentraciones bajas de agente reductor.

El quitosán es una biomolécula muy interesante, ya que es capaz de cumplir con dos funciones a la vez, una de ellas como agente reductor y otra como grupo funcionalizante de las AuNPs permitiendo así la disminución de reactivos, recursos económicos, y permitiendo obtener buenos resultados.

Técnicas espectroscópicas como el UV- vis y la microscopia de barrido electrónico (SEM) son dos herramientas muy útiles en la caracterización de las nanopartículas de oro ya que permiten certificar la síntesis de la mismas y ofrecer una visión de la forma y distribución de las AuNPs, además el análisis por DLS permite obtener una aproximación del tamaño real de las nanopartículas.

Las nanopartículas de oro funcionalizadas con grupos quelantes como el quitosán son una fuente potencial de detectores químicos que pueden ser utilizados para la detección de metales pesados presentes en aguas, ya que ofrecen un resultado eficaz y más rápido que otras técnicas analíticas de mayor complejidad en el análisis químico.

Las condiciones óptimas para el funcionamiento del detector según los resultados obtenidos son un almacenamiento a temperatura ambiente, potenciales de hidrogeno superiores a 7 y aguas donde los metales a detectar se encuentran por encima de los 50 partes por millón.

5. RECOMENDACIONES

Inicialmente se recomienda investigar más a fondo como es el proceso de funcionalización de las nanopartículas de oro, desde un punto de vista más químico y no solo verlo como un proceso que en el que se le da la función a cumplir por la AuNPs, sería interesante conocer más de las interacciones entre el metal y el grupo funcionalizante.

Realizar la caracterización por microscopía electrónica de transmisión de las AuNPs que se puedan obtener por el método de reducción química con el quitosán como agente reductor para obtener un resultado confiable del verdadero tamaño de las nanopartículas.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) NRIAGU J.O. and PACÍAN J. M. Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water, and soils by trace metals. *nature*, 333, (1988),134-139.
- 2) United States Environmental Protection Agency. EPA 816-F-09-004. May 2009. <http://www.epa.gov/ogwdw/consumer/pdf/mcl.pdf>
- 3) EPA G. NORDBER. Metales, propiedades químicas y toxicidad. En: J. FINKLE y col. Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo. Chantal Dufresne, BA 1998,
- 4) POOLE C.P., y OWENS F.J. *Introducción a la Nanotecnología*. Barcelona: Editorial Reverté, (2007).
- 5) KHAN N., RYUA K.Y., CHOIA J.Y., NHOA, E.Y., HABTEA G and CHOIB H. Determination of toxic heavy metals and speciation of arsenic in seaweeds from South Korea (2014), *Food Chemistry*, 169(01):464-470.
- 6) SALERNO M., LANDONI P and VERGANTI R. Designing foresight studies for Nanoscience and Nanotechnology (NST) future developments. *Technol Forecast Soc Change*. (2008), 75: 1202-1223.
- 7) THATAI Sh.,KHURANA P., BOKEN J., PRASAD S. and KUMAR D. Nanoparticles and core-shell nanocomposite based new generation water remediation materials and analytical techniques: A review. *Microchemical Journal*, (2014), 116:62-76.
- 8) FELDHEIM D. and FOSS C.A Jr *Metal Nanoparticles Synthesis, Characterization and applications* 1ª edición 2002, Nueva York: Marcel Dekker .
- 9) GRIBBIN J. and GRIBBIN M., RICHARD FEYNMAN: A life in science 1ª ed. (1997), Nueva York.
- 10)ALI MANSOORI G. *Principles of nanotechnology Molecular-based study of condensed matter in small systems* 1ª Ed 2004 Nueva York Springer.
- 11)TANIGUCHI N. "On the Basic Concept of Nanotechnology", *Actas de la ICPE (International Conference on Production Eng.) Tokyo*, (1974), 18-23.
- 12)SLISTAN-GRIJALVA A., HERRERA-URBINA R., RIVAS-SILVA J.F., ÁVALOS-BORJA M., CASTILLÓN-BATTAZA F.F. and OSADA-AMARILLAS A.. Synthesis of silver nanoparticles in a polyvinylpyrrolidone (PVP) paste, and their optical properties in a film in ethylene glycol. *Materials Research Bulletin*. 43, (2008), 90-96.
- 13)AKAMATSU K., TAKEI S., MINZUHATA M., KAJINAMI A., DEKI S., TAKEOKA S., FUJI M., HAYASHI S. and YAMAMOTO K. Preparation and characterization

- of polymer thin films containing silver and silver sulfide nanoparticles. *Thin Solid Films*, 359 (2000), 55-60.
- 14) WANG H., QIAO X., CHEN J. and DING S. Preparation of silver nanoparticles by chemical reduction method. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 256, (2005), 111-115.
 - 15) PANIGRAHI S., PRAHARAJ S., BASU S., GHOSH S. K., JANA S., PANDE S., VO-DINH T., JIANG H. and PAL T. Self-assembly of silver nanoparticles: synthesis, stabilization, optical properties and application in surface-enhanced Raman scattering. *Journal of Physical Chemistry*, 110, (2006), 13436-13444.
 - 16) LUO C., ZHANG Y., ZENG X., ZENG Y. and WANG Y. The role of poly(ethylene glycol) in the formation of silver nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 288, (2005), 444-448.
 - 17) KIM Y.G., OH S.K. and CROOKS R.M. *Chemistry of Materials*. 16, (2004), 167-172.
 - 18) CENEMES - Servicio de Gestión de la Investigación y transferencia de tecnología, Universidad de Alicante. *Synthesis de nanopartiucles*. (2008)
 - 19) GOODHEW, Peter.J. Humphreys .John Beraland, Richard. *Electron Microscopy and analysis*. Taylor y Francis , Third edition, United states, (2001).
 - 20) DONG B.H and HINESTROZA J.P. Metal Nanoparticles on Natural. Cellulose Fibers Electrostatic Assembly and in situ synthesis. *ACS Appl. Mater. Interfaces*. (2009), 1 (4), 797–803.
 - 21) JAIN P.K., HUANG X., EL-SAYED I.H. and EL-SAYED M.A. Noble metals on the nanoscale: optical and photothermal properties and some applications in imaging, sensing, biology and medicine. *Acc. Chem. Res.* (2008), 41 (12), 1578–1586.
 - 22) ZHENG J., and DICKSON R.M. “Individual water-soluble dendrimer-encapsulated silvernanodot fluorescence”. *J. Chem Soc*, 124, (2002). 13982-13983.
 - 23) SERGEEV G. B. *Nanochemistry* . Amsterdam: Elsevier. (2006).
 - 24) SONDI Y., and SALOPEK-SONDI B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. Coli as a model for Gram-negative bacteria. *J of Coll and Interface Science*, (2004), 275: 177-182.
 - 25) TURKEVICH, J., STEVENSON, P.C. AND HILLIER, J. A study B.J. UV irradiation induced formation of Auof the nucleation and growth processes in the synthesis of nanoparticles at room temperature: The case of pH values.colloidal gold. *Discuss Faraday Soc* (2007), 11: 55-75.
 - 26) TAI Y., TRAN N.T., TSAI Y.C., FANG J.Y., and CHANG L.W. One-step synthesis of highly biocompatible multi-shaped gold nanostructures with fruit extract. *IET Nanobiotechnology*, 2, (2011), 52-59.

- 27) SHARMA J., TAI Y. and IMAE T. Biomodulation approach for gold nanoparticles: Synthesis of anisotropic to luminescent particles. *Chemistry - An Asian Journal*. 5, (2010), 70-73.
- 28) BANERJEE P., SATAPATHY M., MUKHOPADHAY A and DAS P. Leaf extract mediated green synthesis of silver nanoparticles from widely available Indian plants: synthesis, characterization, antimicrobial property and toxicity analysis. *Bioresources and Bioprocessing*. (2014), 1:3.
- 29) PRATHNA T. C., CHANDRASEKARAN N., RAICHUR A. M. and MUKHERJEE A. Biomimetic synthesis of silver nanoparticles by Citrus limon (lemon) aqueous extract and theoretical prediction of particle size. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 82, (2011) 152-159.
- 30) ZHOU Y, WANG S.X ZHANG K, and JIANG X,Y. *Angew Chem Int* (2008) Ed 47 7454- 7456.
- 31) BASAVEGOWDA N., IDHAYADHULLA A and LEE Y.R. Phyto-synthesis of gold nanoparticles using fruit extract of *Hovenia dulcis* and their biological activities. *J Nano Research* 52 (2014) 745–751.
- 32) KAPOOR S. Preparation characterization and surface modification of silver nanoparticles. *Langmuir* 14 (1998). 1021-1025.
- 33) SASTRY M., AHMAD A., KHAN M.I., KUMAR R Biosynthesis of metal nanoparticles using fungi and actinomycete *Current science* 85 (2003), 162-170.
- 34) SHARMA J., TAI Y and IMAE T. Biomodulation approach for gold nanoparticles: Synthesis of anisotropic to luminescent particles. *Chemistry - An Asian Journal*. 5, (2010), 70-73.
- 35) GHODAKE G., EOM C.Y., KIM S.W., and JIN E. Biogenic nano-synthesis; Towards the efficient production of the biocompatible gold nanoparticles . *Bulletin of the Korean Chemical Society*. 31, (2010), 2771-2775.
- 36) HE S., GUO Z., ZHANG Y., WANG J., and GU N. Biosynthesis of the gold nanoparticles using the bacteria *Rhodospseudomonas capsulita* . *Materials letters* 61, (2007) 3984-3987.
- 37) PRATHNA T. C., CHANDRASEKARAN N., RAICHUR A. M and MUKHERJEE A. Biomimetic synthesis of silver nanoparticles by Citrus limon (lemon) aqueous extract and theoretical prediction of particle size. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 82, (2011), 152-159.
- 38) BANKAR, A., JOSHI B.B., KUMAR A.R. AND ZINJARDE S. Banana peel extract mediated novel route for the synthesis of silver nanoparticles. *Colloid Surf A Biogenic* (2010). 368: 58-63.
- 39) BELMARES S., TORRES E., COPARÁN J.L., ARRIAGA J., ELIZONDO N. Síntesis y caracterización de nanopartículas de oro, plata y hierro por el método

- defisicoquímica verde, Departamento de Inmunología, de la Facultad de Medicina, UANL, (2013)
- 40) KOVALCHUK T. , SFIHI H. , KOSTENKO L. , ZAITSEV V. , FRAISSARD J. "Preparation, structure and thermal stability of onium- and amino-functionalized silicas for the use as catalysts supports," *J. Coll. Int Sci.* vol. 302, June. (2006) 214–229.
 - 41) GHOSH, P.S.; KIM, C.K.; HAN, G.; FORBES, N.S.; ROTELLO, V.M. Efficient gene delivery vectors by tuning the surface charge density of amino acid-functionalized gold nanoparticles. *acs nano*(2008), 2, 2213–2218.
 - 42) WANGOO, N.; BHASIN, K.K.; MEHTA, S.K.; SURI, C.R. Synthesis and capping of water-dispersed gold nanoparticles by an amino acid: Bioconjugation and binding studies. *J. Coll. int Sci.*(2008), 323, 247–254
 - 43) GAMAGE, A.; SHAHIDI, F. Use of quitosán for the removal of metal ion contaminants and proteins from water. *Food Chemistry.* (2007). 104(3):989-996
 - 44) MONTERO-ÁLVAREZ. J. A. , PAREDES-BAUTISTA M. J. , RIVERA-MORALES. M. C. Facultad de Ingeniería Química, BUAP 18 Sur y Av. San Claudio, Col. Jardines de San Manuel, Puebla, Pue. (2010)
 - 45) SUGUNAN A. , THANACHAYANONT C. , DUTTA L., HILBORN J.G. Heavy-metal ion sensors using quitosán-capped gold nanoparticles, *Science and Technology of Advanced Materials* 6 (2005) 335–340.
 - 46) LIU.J.Z CAO, AND Y LU. Functional nucleic acid sensor, *Chem Rew* (2009) 109 p 1948-1998
 - 47) GRANDLER J. Principles of chemicals sensors 2° ed 2009, Nueva York, Springer
 - 48) THEAVENOT D. et al . Electrochemicals biosensors. Recommended definitions and classification. *Pure App.Chem.* (1999) 71(12) p 2333-2348.
 - 49) IUPAC. Gold Book- biosensor 2011(citada 2015 25/09) Avariable from [http://goldbook – iupac .org/B00663.html](http://goldbook-iupac.org/B00663.html).
 - 50) KRÜGER, E. DIETRICH, H. SCHÖPPLEIN, E. RASIM, S. KÜRBEL, P. Cultivar, storage condition and ripening effects on physical and chemical qualities of red raspberry fruit. *Postharvest Biology and Technology* 60, (2001), p. 31–37.
 - 51) LA ENCINA., S. J. M.HELLÍN, J. JORDÁN, P. VILA, M.J. RUMPUNEN, K. Characterization on juice in fruits of different Chaenomeles species. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* 37, (2004), p 301–307.
 - 52) GUO, R. and WILSON, L.D. "Synthetically Engineered Chitosan-Based Materials and their Sorption Properties with Methylene Blue in Aqueous Solution." *J. Coll. and Int Sci*, (2012), 388, 225-234.
 - 53) AUFFAN, M.; ROSE, J.; BOTTERO, J.; LOWRY, G.; JOLIVET, J. P.; WIESNER, M. R Towards a definition of inorganic nanoparticles from an

- environmental, health and safety perspective. *Nature Nanotechnology*, 2009, 4, 634-641. DOI: 10.1038/nano.(2009).242
- 54) The Royal Society and The Royal Academy of Engineering. *Nanoscience and nanotechnologies*. Clyvedon Press: Cardiff (2004), pp vii-viii, 5-25.
- 55) KIM, J.; LEE, J. Synthesis and thermally reversible assembly of DNA-Gold nanoparticle cluster conjugates. *Nano Letters*, (2009), 9, 4564-4569.
- 56) BRIGGER I, DUBERNET C, COUVREUR P (2002). "Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis". *Adv Drug Deliv Rev* 54: 631-651.
- 57) GUO, S; WANG, E. Synthesis and electrochemical applications of gold nanoparticles. *Analytica Chimica Acta*, (2007), 598, 181-192.
- 58) DASH M, CHIELLINI F, OTTENBRITE R, CHIELLINI E (2011). "Chitosan- A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications". *Progress in Polymer Science* 36: 981–1014
- 59) MUZZARELLI R. "Chitin". Editorial Pergamon Press. Primera edición, pag. 2 (1974).
- 60) TRAN, H.; TRAN, L.; BA, C.; VU, H.; NGOC, T.; PHAM, D.; NGUYEN, P. Synthesis, characterization, antibacterial and antiproliferative activities of monodisperse chitosan-based silver nanoparticles. *Colloids and Surface A: Physicochemical and Engineering Aspects*, (2010), 360, 32-40.
- 61) FAN, C.; LI, W.; ZHAO, S.; CHEN, J.; LI, X. Efficient one pot synthesis of chitosan induced gold nanoparticles by microwave irradiation. *Materials Letters*, (2008), 62, 3518-3520.
- 62) SHIH, C.; SHIEH, Y.; TWU, Y. Preparation of gold nanopowders and nanoparticles using chitosan suspensions. *Carbohydrate Polymers*, (2009), 78, 309-315.
- 63) SUN, C.; QU, R.; CHEN, H.; JI, C.; WANG, C.; SUN, Y.; WANG, B. Degradation behavior of chitosan chains in the "green" synthesis of gold nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, (2008), 343, 2595-2599
- 64) LONG, N.; VU, L.; KIEM, C.; DOANH, S.; NGUYET, C.; HANG, P.; THIEN, N.; QUYNH, L. Synthesis and optical properties of colloid gold nanoparticles. *Journal of Physics: Conference Series*, (2009), 187, 1-8
- 65) HUANG, H.; YANG, X. Synthesis of chitosan-stabilized gold nanoparticles in the absence/presence of tripolyphosphate. *Biomacromolecules*, (2004), 5, 2340-2346.
- 66) CAFAGGI S, RUSSO R, STEFANI R, LEARDI R, CAVIGLIOLI G, PARODI B, Y COLS. "Preparation and evaluation of nanoparticles made of chitosan or N-trimethyl chitosan and a cisplatin–alginate complex". *Journal of Controlled Release* (2007), 121: 110–123