

Estudio de la estabilidad de nanopartículas y desarrollo de un sensor colorimétrico

Laboratorio de Biomateriales
Facultad de Ciencias
Universidad de la República
(UdelaR)

Dr. Eduardo Méndez
(Orientador)

Lic. Santiago Botasini





Estudio de la estabilidad de las nanopartículas y desarrollo de un sensor colorimétrico

Por Lic. Santiago Botasini

Tesis para optar al título de Doctor en Química de la
Universidad de la República (Uruguay)

Laboratorio de Biomateriales
Instituto de Química Biológica
Facultad de Ciencias
Universidad de la República
Director de Tesis
Dr. Eduardo Méndez

-2016-

" Nos encontramos en los comienzos mismos de la era de la raza humana. No es ilógico que tengamos o que tropecemos con problemas, pero hay decenas de miles de años en el futuro. Es responsabilidad nuestra hacer lo que podamos, aprender lo que podamos, mejorar las soluciones y transmitir las a nuestros sucesores. Es responsabilidad nuestra dejar las manos libres a las generaciones futuras."

Richard Feynman

Agradecimientos

Quiero agradecer en primer lugar a mi orientador el Dr. Eduardo Méndez por su paciencia y dedicación, siendo mi referente académico en mi formación de grado y posgrado.

También agradezco a todos los integrantes del Instituto de Química Biológica y en particular al apoyo del grupo del Laboratorio de Biomateriales, especialmente a la Dra. Fernanda Cerdá, Lic. Laura Luzuriaga y la Lic. Paula Enciso con quienes tuve el gusto de trabajar en estos años.

A la Dra. Leticia Pérez por su ayuda en la parte experimental en los inicios de la Tesis; al Dr. Enrique Dalchiale y al Dr. Ricardo Faccio por dedicarme parte de su tiempo y experiencia en los experimentos de XRD.

A las agencias financiadoras PEDECIBA-Química, CSIC y ANII por el apoyo económico otorgado.

A mi familia por su apoyo incondicional.

Esta página ha sido dejada intencionalmente en blanco.

Índice

Prefacio	8
Objetivos	9
Esquema general de trabajo	9
Capítulo I: Descripción de las técnicas empleadas	13
1.1 Naturaleza de la Luz	13
1.2 Espectroscopía UV-Vis.....	15
1.3 Técnica de Dispersión de Luz (DLS)	22
1.4 Espectroscopía infrarroja (FTIR)	33
1.5 Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM)	44
1.6 Difractometría de rayos X en polvo.....	50
1.7 Voltamperometría cíclica	55
Capítulo II: Estabilidad de los sistemas coloidales	58
2.1 Efecto Tyndall	59
2.2 Teoría Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO)	60
2.3 La doble capa electroquímica.....	63
2.4 Potencial Z	64
2.5 Factores que afectan la estabilidad del coloide.....	65
2.6 Estabilización estérica	67
Capítulo III: Determinación de la pureza del borohidruro de sodio	69
3.1 Introducción	69
3.2 Materiales y métodos.....	70
3.3 Resultados y discusión	72
3.4 Conclusiones.....	98
Capítulo IV: Química de las nanopartículas de plata	99
4.1 Naturaleza química de la plata.....	99
4.2 Síntesis de nanopartículas de plata.....	100
4.3 Destino de las nanopartículas de plata en ambientes reales	103
4.4 Aplicaciones de las nanopartículas de plata	109
Capítulo V: Química del mercurio y sus riesgos para la salud	111
5.1 Aspectos regulatorios del mercurio	112
5.2 Aspectos químicos.....	113

5.3 Formación de amalgamas	115
5.4 Extracción y almacenamiento de las muestras de mercurio	115
Capítulo VI: Sensores de mercurio basados en el uso de nanopartículas	119
6.1 Sensores combinados de nanopartículas con técnicas electroquímicas	130
6.2 Una mirada crítica de los métodos de detección de mercurio	131
Capítulo VII: Estabilidad de las nanoaprtículas de plata	135
7.1 Materiales y Métodos	136
7.2 Resultados y discusión	140
7.3 Conclusiones.....	172
Capítulo VIII: Hacia un sensor colorimétrico de mercurio.....	173
8.1 Materiales y métodos.....	173
8.2 Resultados y discusión	176
8.3 Conclusiones.....	192
Capítulo IX Conclusiones generales y perspectivas futuras	193
Referencias	194
ANEXO I.....	204
ANEXO II	207
ANEXO III.....	210
ANEXO IV	211

Prefacio

Fundamento de la propuesta de posgrado

El acelerado desarrollo de la Nanotecnología vino acompañado de la propuesta de soluciones nanotecnológicas para los problemas de actualidad. Uno de las áreas que más se ha visto beneficiada de estos desarrollos ha sido la Química Analítica, en la que la introducción de los sensores colorimétricos ha permitido bajar los límites de detección a niveles jamás alcanzados, y más importante aún, ha colaborado en el desarrollo de técnicas sencillas y sin uso de instrumental avanzado que permita la descentralización¹⁻⁹.

Básicamente, los sensores colorimétricos son dispositivos formados por nanoestructuras que modifican su capacidad de absorber la luz por cambios en su entorno fisicoquímico. Esta capacidad de absorber la luz en las nanoestructuras es una de las características más sobresalientes que presentan estos sistemas. Dada la alta relación que existe, en cuanto a cantidad, entre los átomos superficiales y los átomos internos que conforman la partícula, es posible observar el fenómeno de plasmón superficial, que se relaciona con el movimiento colectivo de los electrones en respuesta a la incidencia de la radiación electromagnética en el rango de longitudes de onda del espectro visible¹⁰. Este movimiento de electrones se produce a cuenta de la absorción de parte de la energía suministrada por la luz incidente, dando lugar a la aparición de un color característico en la solución coloidal.

Es importante considerar las ventajas que poseen las nanoestructuras en la absorción de la luz. Por un lado, las bandas del plasmón superficial poseen un valor de absorptividad molar que es varios órdenes mayor ($10^7 - 10^9 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)¹¹ que los colorantes más comunes empleados en Química Analítica ($10^4 - 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Por otra parte, las variaciones en el entorno fisicoquímico pueden producir cambios en la capacidad de absorción de la luz que se ve reflejado en un cambio del color, o de su intensidad. Estos cambios en el entorno fisicoquímico pueden ser de varios tipos: modificaciones superficiales por adsorción de otras moléculas, agregación de las nanopartículas, cambios en la fuerza iónica del medio, etc.

La mayoría de los sensores se basan en el hecho que cuando dos nanopartículas se aproximan, se produce un cambio en la posición del plasmón que es lo suficientemente

grande (varias centenas de nm) como para producir un cambio de color notorio. En teoría, todo aquel proceso que conduzca al acercamiento de las nanopartículas constituiría la base de un sensor colorimétrico. Con base en este razonamiento, los sensores basados en la interacción específica de un antígeno y un anticuerpo, ambos unidos a nanopartículas, son los que han encontrado mayor difusión ^{5,7,8,13,14}.

Una revisión cuidadosa de la literatura permite comprobar que la mayoría de los sensores propuestos, principalmente basados en el acercamiento de nanopartículas, han sido probados en condiciones de laboratorio, y que rara vez se han empleado en el análisis de muestras reales. La razón de esto es sencilla: las nanopartículas se encuentran formando soluciones coloidales, que son fuertemente dependientes de la fuerza iónica ¹⁵⁻²². Al aumentar la fuerza iónica del medio, las nanopartículas pierden su recubrimiento y se agregan, cambiando de color la solución. En este sentido es indispensable ahondar en los mecanismos que rigen el proceso de agregación de las partículas para poder controlar las variables del entorno fisicoquímico que puedan afectar la respuesta colorimétrica de los sensores.

OBJETIVO GENERAL

La propuesta de trabajo de posgrado consiste en buscar profundizar en el conocimiento del fenómeno de agregación de nanopartículas, mediante el estudio de los diferentes parámetros que inciden en el mismo, para luego utilizar esta información en el diseño de un posible sensor colorimétrico del mercurio.

Objetivos específicos

Dentro de los objetivos específicos se enmarcan los estudios de la estabilidad de soluciones coloidales de nanopartículas frente a la agregación causada por la presencia de sales en el medio, la estabilidad respecto al tiempo de almacenamiento y la aplicación de estos conocimientos en la puesta en práctica de la viabilidad en el desarrollo de un sensor colorimétrico de mercurio.

Esquema general del trabajo

El plan estratégico planteado en la propuesta del plan de Tesis se enfoca en profundizar en los conocimientos básicos de las nanopartículas de plata en aras de caracterizar correctamente al sistema, para luego poder aplicar racionalmente los conocimientos nuevos

para el desarrollo de un sensor colorimétrico de mercurio (Figura 1). En este marco, el trabajo de Tesis de posgrado se divide en cuatro etapas:

La primera corresponde a la elección del agente de recubrimiento, al método de síntesis y a la caracterización de las nanopartículas generadas combinando varias técnicas (espectroscopía UV-Vis, DLS, TEM). Durante la realización de esta etapa, se abre una puerta transversal de investigación, motivada por la necesidad de contar con un método de rutina para la evaluación de la pureza de uno de los reactivos de la síntesis de nanopartículas, el borohidruro de sodio. Esta investigación culmina con el planteo de un protocolo por espectroscopía infrarroja para la evaluación de la pureza del reactivo.

Una vez controlados los parámetros involucrados en la síntesis, se puso en marcha la segunda etapa correspondiente al estudio de la estabilidad de las nanopartículas de plata. Dentro de este contexto se plantea un método teórico para la evaluación del estado de agregación de las partículas, el cual permite comprender los resultados en términos termodinámicos que engloban los diferentes factores responsables del proceso de agregación de las partículas.

Durante los ensayos de estabilidad con diferentes agentes de recubrimiento se observa un comportamiento singular para el caso de las nanopartículas recubiertas de almidón, las cuales son resistentes al aumento de la fuerza iónica del medio. Asimismo, se observa un comportamiento diferencial en función del electrolito empleado como agente de agregación. En este sentido, a la fecha de realización de la Tesis se desconocía de forma directa y clara el rol particular que jugaban las sales de halogenuros como el cloruro de sodio, el cual se encuentra en abundancia en ambientes acuosos. Se plantea entonces un nuevo problema que consiste en estudiar el proceso de agregación de las nanopartículas, mediante un mecanismo independiente de la fuerza iónica, planteando evidencias experimentales concretas de la presencia de complejos clorurados de plata como los principales protagonistas. Conjuntamente con los ensayos de estabilidad frente al agregado de sales, se realizan estudios de estabilidad coloidal con el tiempo y con los cambios de temperatura para el almacenamiento de las muestras sintetizadas.

Finalmente, se plantea el estudio de la viabilidad de utilizar las nanopartículas para la detección colorimétrica del mercurio empleando la estrategia de amalgamación y haciendo

especial énfasis en la importancia de controlar bien la presencia de cloruros, los cuales se encuentran de forma ubicua en ambiente reales.

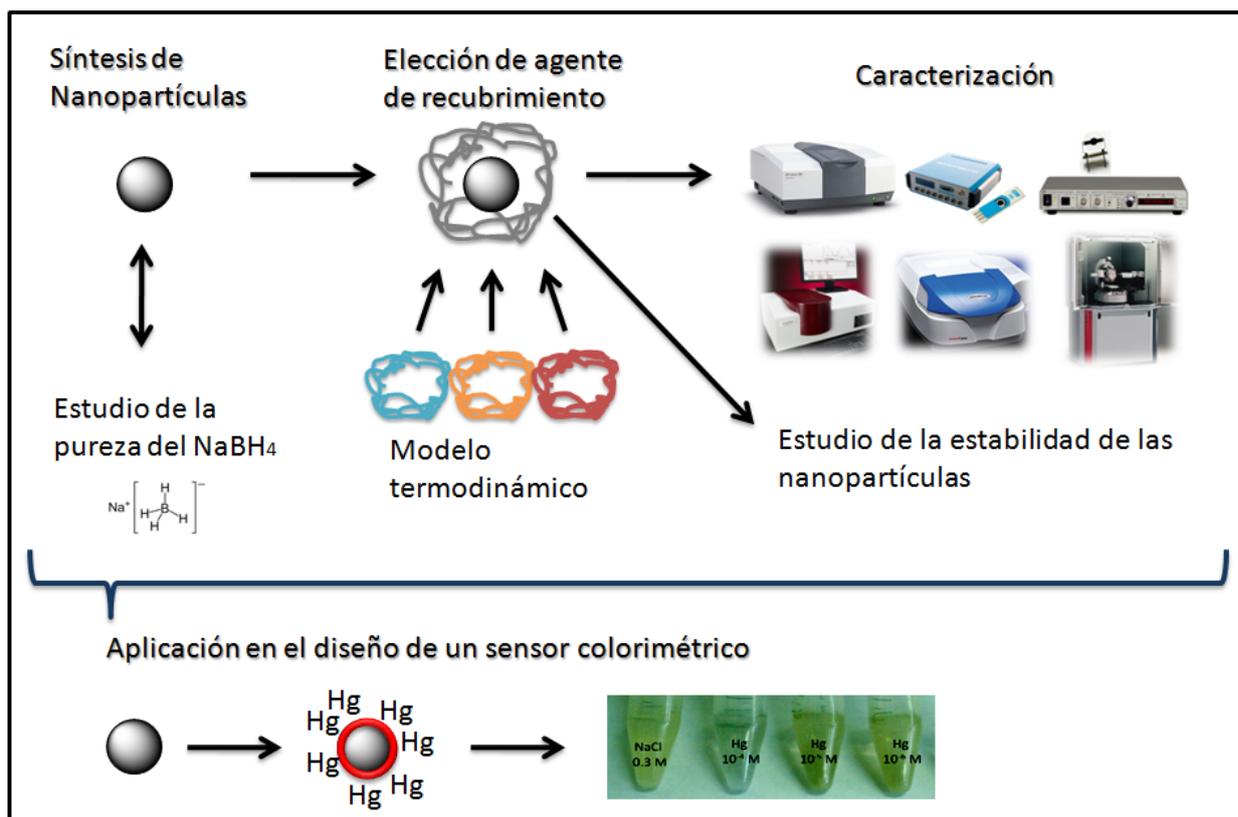


Figura 1: Mapeo general de las distintas etapas que conforman el plan de trabajo de la Tesis de Posgrado. Por un lado existe una etapa de investigación básica enfocada a la caracterización del sistema de trabajo y en segunda instancia, una componente aplicada, enfatizada en la puesta en práctica de los conocimientos generados en la búsqueda de un sensor colorimétrico de mercurio.

Durante la propuesta original de Tesis, se habían planteado una serie de interrogantes, utilizadas como hipótesis en los diseños experimentales, actuando de eje central del trabajo de posgrado. Algunas de estas eran:

1. ¿Existe una concentración crítica para la agregación de nanopartículas?
2. De ser así, ¿de qué depende esta concentración crítica?
3. ¿Cómo influye el tamaño del agente de recubrimiento?, ¿y sus grupos funcionales?
4. ¿Cuál es la influencia del anión del electrolito empleado en fijar la fuerza iónica del medio?

Cada una de estas cuestiones se responde a lo largo de los capítulos subsiguientes con la mirada focalizada en comprender a fondo el sistema de trabajo, pero sin olvidar su importancia en el contexto de los desarrollos de los sensores de mercurio.

Capítulo I: Descripción de las técnicas empleadas

La nanociencia es un área de estudio multidisciplinaria de gran crecimiento en los últimos años, en donde la síntesis y la caracterización de nanopartículas representan el pilar básico para entender las propiedades de la materia, propias del mundo nano. Naturalmente las técnicas empleadas para la caracterización de las diferentes nanoestructuras dependerán del material de estudio; sin embargo algunas de estas técnicas son hoy en día consideradas de rutina y por tanto indispensables para cualquier investigador que esté trabajando sobre estos sistemas. Entre las mencionadas, se encuentran: la espectroscopía electrónica (UV-Vis), la microscopía de transmisión electrónica (TEM), las técnicas de dispersión de luz (DLS), la medida del potencial Z, la espectroscopía infrarroja (FTIR) y la difracción de rayos X (XRD).

El objetivo del presente capítulo será abordar los fundamentos básicos de cada una de las técnicas empleadas y su aplicación concreta al análisis de nanopartículas. En particular se hará hincapié en las potencialidades y las limitaciones prácticas de cada una de las técnicas, así como también en los cuidados especiales que se deben tener a la hora de preparar las muestras para su medición; incluyendo valiosos consejos prácticos, que surgen de la experiencia experimental directa.

1.1 Naturaleza de la luz

Como en una moneda de dos caras, existen dos formas de visualizar y entender a la luz a través del concepto de la dualidad onda-partícula. En la física clásica, ambas visiones corren en paralelo dando lugar a propiedades definidas diferentes, y encuentran su cruce solamente en la descripción de la física cuántica. La aplicación de una u otra definición dependerá del problema en cuestión planteado, para el que se podrá recurrir a la interpretación corpuscular u ondulatoria, dependiendo del caso. Es por esto que, por ejemplo, para entender a fondo la técnica de dispersión de luz, en algunos casos se optará por describirla como simples corpúsculos (fotones) chocando contra las partículas en suspensión, mientras que en otras situaciones se deberá recurrir a la naturaleza ondulatoria,

para entender los fenómenos de interferencia y fluctuaciones en la intensidad de los haces dispersados²³.

Según la teoría ondulatoria, la luz es simplemente una pequeña parte del espectro electromagnético capaz de propagarse en el espacio. La porción visible se extiende entre ca. 380 y 780 nm (Figura 1). Este es el rango de longitudes de onda capaces de excitar las células en las retinas humanas, dando lugar a los diferentes colores observados dependiendo de las frecuencias que los cuerpos son capaces de absorber y/o reflejar. Dentro de este contexto de percepciones del color, se define el sistema rojo - verde - azul conocido también como *RGB* (**R**ed, **G**reen, **B**lue) que se considera idealmente como el conjunto de colores primarios con los que se pueden representar una muy amplia gama de colores visibles. El sistema *RGB* se utiliza en varios ámbitos que van desde la informática, la fotografía y hasta el análisis químico para clasificar a las sustancias de acuerdo su color.



Figura 1: Espectro electromagnético y paleta de colores del sistema *RGB*.

Las soluciones coloidales de nanopartículas metálicas presentan una amplia variedad de colores, que varían dependiendo del tamaño y la forma, por lo que el sistema *RGB* resulta útil para la clasificación primaria del tipo de partículas cuando se encuentran en solución²⁴.

Desde el punto de vista ondulatorio, sin importar la región del espectro, la luz es en esencia una onda electromagnética que se propaga. Si se considera la propagación en el sentido del eje X, el campo eléctrico $[E(x,t)]$ puede calcularse como:

$$E(x, t) = E_0 \cos(\omega t - kx + \Phi) \quad (1)$$

donde Φ es la fase (valor de E a $t=0$ y $x=0$), k el número de onda ($\frac{2\pi}{\lambda}$) y ω es la frecuencia angular de la luz con $\omega = 2\pi\nu$ y $\nu = c/\lambda$ siendo c la velocidad de la misma en el vacío ($3.0 \times 10^8 \text{ m s}^{-1}$) y λ su longitud de onda.

A su vez, a partir de la magnitud del campo eléctrico, se puede establecer la intensidad de la luz en el vacío (I_0) como:

$$I_0(x) = \epsilon_0 c \langle E^2(x, t) \rangle \quad (2)$$

donde $\epsilon_0 = 8.85 \times 10^{-12} \text{ F m}^{-1}$ es la permisividad en el vacío²³.

En resumen, la luz no es otra cosa que el nombre que reciben las ondas electromagnéticas que se encuentran en un rango de longitudes de onda determinado. Como tal tiene un campo electromagnético y una intensidad asociada. Más adelante se verá que todos los fenómenos de absorción y dispersión pueden entenderse como interacciones del campo electromagnético de la luz con la materia.

Por su parte la teoría corpuscular de la luz, originalmente descrita por Newton, define a la misma como un haz de partículas sin carga y sin masa denominadas *fotones*. Max Planck, al comienzo del siglo XX, postuló que la luz está formada por corpúsculos los cuales pueden intercambiar energía con la materia, pero siempre de forma discreta en múltiplos enteros de paquetes de energía denominados *cuantos*. De esta forma la luz se compone de un haz de fotones, cada uno transportando una cantidad de energía fija (E) la cual se calcula como:

$$E = h\nu \quad (3)$$

dónde h corresponde a la constante de Planck ($6.63 \times 10^{-34} \text{ J s}$) y ν es la frecuencia de la luz²⁵.

1.2 Espectroscopía UV-Vis

La espectroscopía por UV-Vis, es quizás la caracterización primaria más simple a la hora de evaluar los productos de la síntesis de nanopartículas. La técnica puede ser empleada para diversos sistemas, siendo especialmente útil para caracterizar nanopartículas metálicas, dado que las mismas presentan un espectro de absorción diferente dependiendo de la naturaleza del material, de la forma y tamaño de la partícula, lo cual puede explicarse siguiendo el concepto de *plasmón superficial*.

El plasmón

Cuando una nanopartícula metálica esférica es irradiada con luz, la oscilación del campo eléctrico (producto de la propia naturaleza electromagnética de la onda luminosa) genera una oscilación coherente de los electrones del metal (Figura 2). Este fenómeno se denomina *oscilación del plasma* (por analogía entre el esquema dinámico de los electrones del metal y el movimiento de iones en un plasma).

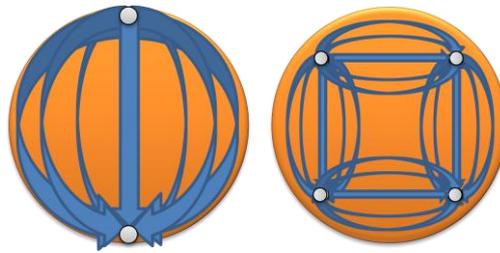


Figura 2: Esquema ilustrativo de la resonancia del plasmón. Se representa la oscilación de la nube electrónica del metal causada por una onda electromagnética, dando lugar a la oscilación dipolar (izquierda) y cuadrupolar (derecha). Adaptado de referencia¹⁰.

La frecuencia de vibración de la nube electrónica es llamada frecuencia del plasma, ω_p , que en el marco de la mecánica cuántica se denomina *plasmón*, y que se relaciona con su energía (E_p) de acuerdo con:

$$E_p = h \omega_p \quad (4)$$

donde h es la constante de Planck.

Algunos autores también utilizan el término de *resonancia del plasmón (dipole particle plasmon resonance)* para referirse a la mencionada oscilación colectiva de los electrones²⁶.

La frecuencia de oscilación depende de cuatro factores: la densidad de electrones, la masa efectiva de los electrones, la forma y el tamaño de la distribución de cargas en el metal. En consecuencia existen distintos modos o niveles de oscilación. El más simple, en el que toda la nube de electrones se mueve de forma paralela al campo generado, se denomina *modo dipolar*. Alternativamente existe un *modo cuadrupolar*, generado cuando la mitad de los electrones se mueven de forma paralela al campo eléctrico y la otra mitad se mueve de forma anti paralela¹⁰. La presencia de uno o más dipolos depende del tamaño de la

partícula esférica. Incluso para partículas grandes como de polvo o una gota de lluvia, la teoría de Mie predice la formación de dipolos de niveles mayores. En general las más pequeñas, como es el caso de la escala nano, solamente presentan dos modos posibles, el dipolar y/o el cuadrupolar (Figura 2). Además del tamaño, las propiedades ópticas de las nanopartículas dependen también de la naturaleza de las mismas y del medio en el cual se encuentren^{27,28}.

Interpretación de los espectros de extinción

Los espectros de extinción de las nanopartículas metálicas aportan una gran cantidad de información sobre la naturaleza, tamaño, forma y modificaciones del entorno fisicoquímico de las nanopartículas. Es claro que los mismos no son huellas dactilares de determinada partícula, sin embargo si se conocen algunas variables del sistema, es posible utilizar los espectros de extinción para inferir otras propiedades.

Lo primero que se observa en un espectro es la posición del máximo, la cual da cuenta del modo de vibración predominante de las nanopartículas, el cual a su vez depende del tamaño, forma y naturaleza de la misma. A modo de ejemplo, si se trabaja con nanopartículas de plata esféricas, es esperable obtener una banda de absorción en el entorno de los 400 nm, en cambio si se trabaja con nanopartículas de oro, el máximo se encontrará a 530 nm. Asimismo, si se sabe que se está trabajando con sales de plata y uno quiere saber si su síntesis de nanopartículas genera poblaciones mayoritarias fundamentalmente triangulares, se debería observar un máximo de absorción cercano a los 800 nm, dado que el modo dipolar en el plano aparece en esa región (Figura 3).

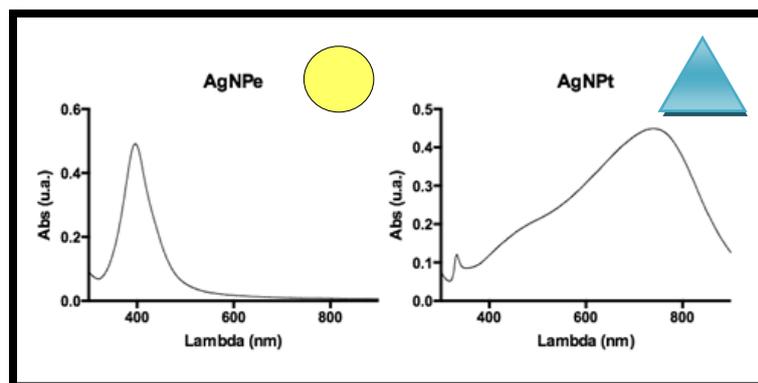


Figura 3: Espectro de nanopartículas de plata esféricas (izquierda) y triangulares (derecha).

El tamaño también puede afectar la posición del máximo observado. A mayor tamaño de partícula se observa un corrimiento del máximo hacia mayores longitudes de onda (Figura 4).

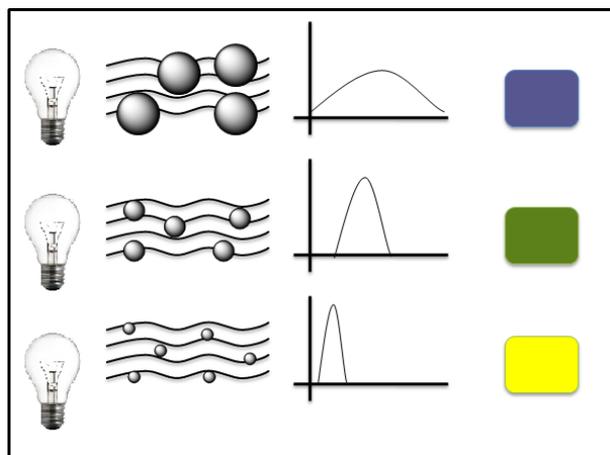


Figura 4: Esquema que representa el corrimiento de la banda del plasmón de nanopartículas al variar el tamaño.

Los fenómenos de agregación de partículas también pueden ser estudiados por este método dado que en esencia un agregado de partículas es equivalente a obtener una partícula de mayor tamaño y por ende existirá un corrimiento del máximo hacia longitudes de onda de menor energía. Dependiendo del sistema también puede incluso llegar a observarse junto con los corrimientos de las bandas un aumento de la línea de base, que surge como consecuencia de la aparición de turbidez.

Otro aspecto práctico y útil de los espectros UV-Vis, es observar los fenómenos de intercambio de ligandos. Dado que el fenómeno de absorción depende del entorno fisicoquímico de la nanopartícula, un intercambio en el agente de protección generará pequeños corrimientos en la longitud de onda del plasmón, el cual puede ser utilizado para identificar el fenómeno. Mediante cálculos computacionales²⁹ se determinó que los máximos de absorción de las bandas de resonancia aumentan concomitantemente con el índice de refracción del medio. Estos mismos autores encontraron una relación matemática teórica, aplicando el método DDA (*discrete dipole approximation method*), entre los índices de refracción y la posición del máximo, válida para medios que no absorban luz:

$$\lambda_2 = \lambda_1 + (\lambda_1 - \lambda_0)(n_2 - n_1) \quad (5)$$

donde n_1 y n_2 corresponden a los índices de refracción del medio 1 y 2 respectivamente, y λ_0 es la longitud de onda constante, que depende del metal (para la plata vale 316 nm), y no varía con el medio en el que se encuentre.

Otro parámetro útil a observar en un espectro de extinción son las variaciones del ancho medio de pico, el cual da cuenta de la distribución de tamaño de las partículas. Cuanto mayor sea el ancho medio del pico, mayor será la variabilidad en los tamaños. Más aún, los incrementos en el ancho medio de pico posiblemente responden a la disminución del espacio inter-partícula, lo cual evidencia la presencia de procesos de agregación³⁰.

Por su parte la absorbancia dependerá de la naturaleza de la nanopartícula (tanto del metal como del ligando) y de la concentración de la muestra. Para partículas esféricas el comportamiento óptico se describe de forma completa por la teoría de Mie.

Teoría de Mie

En el año 1908 Gustav Mie publica un trabajo completo^{27,31} sobre el efecto en el tamaño de las partículas coloidales sobre la dispersión de luz, basado en las ecuaciones del electromagnetismo de Maxwell, que explica de forma sorprendente las observaciones experimentales, adelantándose varios años a su época con conceptos que hoy son propios de la nanociencia. La teoría de Mie sigue vigente hoy día para predecir los espectros de absorción y dispersión de luz de soluciones de nanopartículas esféricas homogéneas.

El trabajo de Mie consistió en explicar las diferencias de colores que presentan las soluciones coloidales de partículas de oro de diferente tamaño, basándose en el efecto que se genera en las constantes dieléctricas de las partículas en presencia de luz. Estos conceptos fueron más tarde reinterpretados en términos de resonancia del plasmón superficial de las partículas.

De acuerdo con la Teoría de Rayleigh, la intensidad de luz dispersada depende del radio de las partículas y de la longitud de onda, teniendo en cuenta que a concentración constante, la radiación de una suspensión es tanto mayor cuanto más grande sean las partículas. Esta teoría es válida hasta cierto tamaño, pero a medida que este disminuye, las ecuaciones descritas por Rayleigh no se acompañan a las observaciones experimentales. El gran logro de Mie con su teoría fue ampliar esta teoría, explicando los fenómenos para cualquier tamaño

de partícula. Partiendo de las ecuaciones de Maxwell, Mie, logra deducir la teoría de Rayleigh así como también llegar a expresiones que expliquen el comportamiento de soluciones homogéneas de partículas esféricas sin importar el tamaño.

Estudiando soluciones coloidales de nanopartículas de oro, Mie encontró que al aplicar las ecuaciones de Raleigh para cierto tamaño de partícula (nanométrico) las radiaciones emitidas eran por lo general considerablemente mayores que la de las partículas perfectamente conductoras, como se ve en el azul y el violeta. El fenómeno observado era equivalente a pensar que la frecuencia de la radiación incidente era coincidente con la frecuencia propia de los átomos de oro. De esta manera, haciendo cálculos logró predecir los espectros de extinción de partículas coloidales explicando los colores llamativos observados en las soluciones, los cuales surgen de la interacción diferencial de las longitudes de onda de la luz cuando su campo electromagnético entra en resonancia con los átomos de las partículas del metal. Esta idea inicial de Mie es la que hoy se conoce como resonancia del plasmón superficial, y de ella dependen la posición de los máximos de absorción en el espectro dependiendo del tamaño y forma de la partícula (Tabla 1).

Tabla 1 Interpretación de los máximos observados en los espectros de los nanotriángulos en el UV-Vis-NIR.

Posición del máximo de absorción	Interpretación en función del modo de resonancia	Observaciones
ca. 358 nm	Modo cuadrupolar	Esfera de 60 nm
ca. 369 nm	Modo cuadrupolar	Esfera de 30 nm
ca. 422 nm	Modo dipolar	Esferas
600-1000 nm	Modo dipolar sobre el plano (<i>dipolar in-plane</i>) para nanotriángulos.	El valor exacto dentro del rango depende del tamaño de la nanopartícula.
400-600 nm	Modo dipolar fuera del plano (<i>dipolar out of plane</i>) y al modo cuadrupolar sobre el plano (<i>quadrupolar in plane</i>), para nanotriángulos.	Los valores exactos dependen del tamaño de la nanopartícula. El pico del modo dipolar fuera del plano es un máximo pequeño y está ubicado hacia longitudes de onda menores respecto al cuadrupolar fuera del plano
ca. 340 nm	Modo cuadrupolar fuera del plano (<i>quadrupolar out of plane</i>).	Nanotriángulos

Capacidades y limitaciones de la espectroscopía por UV-Vis

La espectroscopía UV-Vis, es un análisis simple y rápido, considerado de rutina a la hora de caracterizar las nanopartículas metálicas. Brinda información sobre la forma, tamaño, estado de agregación recubrimiento y naturaleza del metal que conforman la nanopartícula. Sin duda es una herramienta valiosa a la hora de caracterizar los sistemas coloidales. Las medidas del ancho medio de pico por UV-Vis en comunión con las simulaciones del espectro de absorción, siguiendo la teoría de Mie, permiten estimar a grandes rasgos el tamaño de las nanopartículas esféricas. Sin embargo, dado que existen varios factores que pueden afectar el perfil del espectro de absorción, se debe ir con cuidado a la hora de interpretar los resultados observados. A modo de ejemplo un cambio en el tamaño de la partícula puede ser confundido con un cambio en la forma o con un intercambio del agente de protección. En cualquier caso la interpretación de los resultados quedará sujeta a la variable modificada en cada caso, complementando la técnica con otros métodos de caracterización pertinentes.

1.3 Técnica de dispersión de luz (DLS)

Existen diferentes técnicas para medir el tamaño de una partícula, entre éstas se encuentran las medidas por dispersión de luz (*Dynamic Light Scattering [DLS]*). La técnica se basa en extrapolar las medidas de tamaño de las partículas a partir de los coeficientes de difusión que surgen como resultado del movimiento browniano²³. Antes de seguir con los detalles de la técnica, es oportuno adelantar que en DLS se entiende por tamaño de partícula al diámetro de la esfera que difunde a la misma velocidad que la partícula medida. En otras palabras, en DLS se asume que todas las partículas son esféricas y que los agregados se comportan como una sola entidad de mayor tamaño. Esto será particularmente importante a la hora de elegir correctamente la técnica a utilizar para el sistema concreto que se quiera analizar, dado que las medidas de tamaño pueden variar sustancialmente dependiendo del método de medida.

Fundamentos de la Técnica

El equipo de DLS mide el tamaño de las partículas a partir de las medidas de dispersión de luz. Cuando la luz atraviesa una solución coloidal parte de los rayos que llegan siguen su trayectoria normal (luz transmitida), mientras que otra parte choca con las partículas presentes desviando su trayectoria en todas direcciones (luz dispersada), dependiendo de la posición relativa de las partículas en ese instante. Es claro que el movimiento browniano es por definición aleatorio y por tanto si se colocara un fotodetector a un ángulo de 90° respecto del haz de luz incidente, se mediría una intensidad de luz dispersada que variaría con el tiempo dependiendo de la posición de las partículas a cada instante. Contrariamente a lo que se podría pensar, esta dispersión de luz no es completamente aleatoria, sino que guarda información del movimiento relativo de las partículas.

¿Cómo es posible obtener información de un movimiento aleatorio?

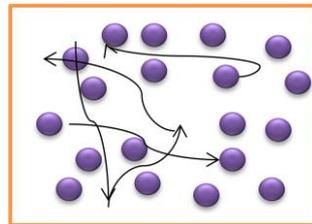
Movimiento browniano

El concepto de movimiento browniano ha sido objeto de diversos modelos (no solo fisicoquímicos), que trasciende a otras disciplinas como el área biológica, la economía, la dinámica de poblaciones, etc. Su origen, no obstante, deriva de las observaciones del

botánico escocés Robert Brown en 1827, al percatarse del movimiento aleatorio de pequeñas partículas de polen suspendidas en una gota de agua, fenómeno que más tarde se vería en otras partículas pequeñas sin importar la naturaleza de las mismas. En 1905 Albert Einstein ³² publica por primera vez el modelo matemático que describe el fenómeno, argumentando que el movimiento aleatorio de las partículas en suspensión es consecuencia del bombardeo de las moléculas que componen el fluido resultante de la agitación térmica. A partir de la Teoría de Einstein-Stokes sobre el movimiento browniano es posible calcular el coeficiente de difusión de las partículas en suspensión, que se encuentran bajo régimen de movimiento aleatorio de acuerdo con la ecuación:

$$D = \frac{RT}{N_A} \frac{1}{6\pi\eta r} \quad (6)$$

donde D es el coeficiente de difusión medio de las partículas, R es la constante universal de los gases, T es la temperatura absoluta, N_A es el número de Avogadro, η la viscosidad y r el radio de las partículas.³³



Movimiento browniano

La intensidad de luz dispersada, debido al movimiento browniano de las partículas que llega al fotodetector, no es siempre la misma dado que en cada instante cambia la posición de las partículas y por tanto también el patrón de interferencia de la onda luminosa. Estas variaciones son completamente aleatorias, la intensidad puede aumentar o disminuir de un momento a otro con la misma probabilidad con la que una moneda tirada al azar puede fluctuar entre cara o número; sin embargo la magnitud del cambio respecto al tiempo depende del coeficiente de difusión de las partículas y por ende de su tamaño (Figura 5). En consecuencia existe una cierta correlación entre la intensidad medida en un instante y la intensidad medida en el instante siguiente. En términos matemáticos la función que compara una medida consigo misma a lo largo del tiempo se conoce como *función de autocorrelación* y constituye el fundamento básico del equipo de medida.

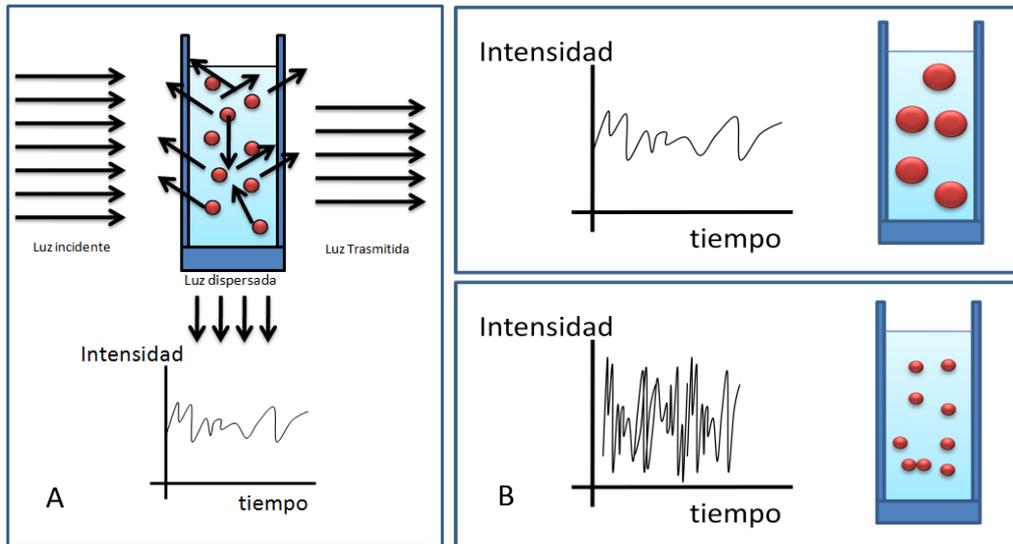


Figura 5: Esquema de funcionamiento del equipo de DLS. El fotodetector ubicado a 90° respecto a la luz incidente del laser capta la luz dispersada que fluctúa de manera aleatoria (A). Sin embargo existe una cierta correlación entre la velocidad de cambio de las fluctuaciones de intensidad con el tamaño de las partículas (B).

La función de autocorrelación es un artilugio matemático que permite comparar dos señales desfasadas en el tiempo. En esencia se mide la intensidad a diferentes tiempos y para cada uno se calcula el promedio de las intensidades acumuladas. Los valores se grafican en función del tiempo dando lugar a una curva que se asemeja a una sigmoidea, pero cuya caída puede ser descrita por una función exponencial decreciente. Matemáticamente la función de autocorrelación se define como:

$$G(\tau) = \langle I(t) I(t + \tau) \rangle = \frac{1}{T} \int_0^T I(t) I(t + \tau) dt \quad (7)$$

donde $G(\tau)$ representa la función de autocorrelación, cuyo valor es máximo al inicio (cuando las intensidades son iguales) y disminuye hasta llegar 0 para intervalos de tiempo grandes (cuando el valor de intensidades es completamente aleatorio) (Figura 6).

Experimentalmente se observa que la función de autocorrelación presenta un decaimiento exponencial con el tiempo dependiente del coeficiente de difusión (D) de las partículas de acuerdo con la ecuación:

$$G(\tau) = A[1 + B \exp(-Dq^2\tau)] \quad (8)$$

donde $q = \frac{4\pi_0}{\lambda_0} \text{sen}(\theta/2)$, A y B son constantes que representan la línea de base y el factor instrumental respectivamente y θ es el ángulo entre la muestra y la luz dispersada. La función $G(\tau)$ a menudo también se representa como:

$$G(\tau) = A[1 + B(g(\tau)^2)] \quad (9)$$

$$g(\tau) = \exp(-Dq^2\tau) \quad (10)$$

de forma de poder distinguir la función de caída exponencial a partir de la cual se realizan los cálculos de los coeficientes de difusión de las soluciones coloidales tamaño de partículas.

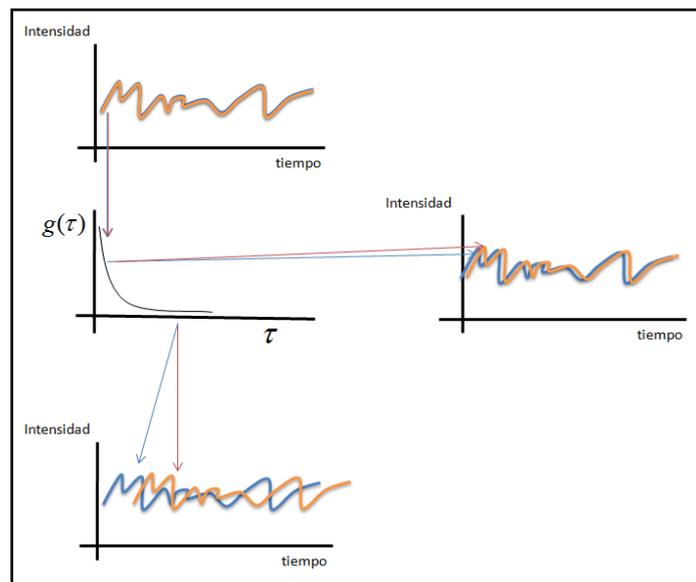


Figura 6: La imagen esquematiza el significado físico de la función de autocorrelación, mostrando que a tiempos pequeños de medida existe una fuerte correlación de intensidades y por tanto la función presenta un máximo, que cae de forma exponencial con el tiempo hasta llegar a 0, indicando que no existe correlación alguna entre las señales.

A partir de las curvas de autocorrelación de una muestra monodispersa pueden obtenerse el valor de los coeficientes de difusión. Luego mediante la ecuación de Einstein-Stokes (Ec. 6) se obtiene el valor del tamaño de las nanopartículas.

Para el caso de una muestra polidispersa, la expresión para $g(\tau)$ que describe la función de autocorrelación queda definida por una combinación lineal de funciones exponenciales:

$$g(\tau) = \int_0^{\infty} P(\Gamma) e^{-\Gamma\tau} d\Gamma \quad (11)$$

donde $P(\Gamma)$ representa la función de distribución de la población de partículas y $\Gamma = Dq^2$. Desde el punto de vista práctico, para resolver la integral, la función $g(\tau)$ se representa en forma discreta como una combinación lineal de n exponenciales:

$$g(\tau) \cong \sum_i^n c_i \exp(\Gamma_i, \tau) \quad (12)$$

En la forma de matriz la expresión puede describirse como

$$g(\tau) = \mathbb{Y} = \phi \mathbb{X} + \varepsilon \quad \text{con} \quad \phi_{ji} = e^{-\Gamma_j \tau_i} \quad (13)$$

La Ec. (13) permite definir un resultado aproximado de la función de autocorrelación, por lo que la expresión absoluta tiene un error asociado (ε). Existen diferentes algoritmos diseñados para minimizar el valor de ε y obtener la distribución de tamaños de nanopartículas. En la práctica no hay ninguno mejor que otro, sino que la aplicación de cada uno de ellos dependerá de la muestra de estudio.

Algoritmos para el cálculo de tamaños de nanopartículas

Algoritmo de cumulantes

Es el algoritmo más simple y ampliamente usado en la presentación de tamaños de nanopartículas. Se basa en el ajuste de la función de autocorrelación por medio de un desarrollo de Taylor ³⁴:

$$g(\tau) = e^{-\langle \Gamma \rangle \tau} \left(1 - 0 + \frac{k_2^2}{2!} \tau^2 - \frac{k_3^3}{3!} \tau^3 + \dots \right) \quad (14)$$

La norma ISO 13321:1996 establece este método como el más apropiado para la determinación del diámetro efectivo de partículas. Sin embargo el análisis acumulativo no permite diferenciar distribuciones de tamaño, sino que define un diámetro promedio entre todas las poblaciones existentes.

Si bien no es posible distinguir poblaciones, existe el llamado *índice de polidispersión* (IP), cuya magnitud está en directa relación con el ancho de distribución de tamaños de partículas.

Matemáticamente el IP se define como:

$$IP = \frac{k_2}{\langle \Gamma \rangle^2} \quad (15)$$

donde k_2 representa el segundo término del polinomio de Taylor.

Algoritmo CONTIN

Este algoritmo se basa en calcular la función $g(\tau)$ a partir de la transformada inversa de Laplace e impone un factor de regularización para definir los valores de la matriz inversa:

$$g(\tau) = L|P(\Gamma)| = \int_0^\infty P(\Gamma)e^{-\Gamma\tau}d\Gamma \quad P(\Gamma) = L^{-1}|g(\tau)| \quad (16)$$

Este tratamiento matemático se realiza por métodos numéricos y permite distinguir entre diferentes poblaciones de partículas. Sin embargo como contrapartida necesita de una gran cantidad de valores, para minimizar el error en la construcción de la matriz de transformación, dado que en presencia de ruido existe más de una matriz que satisface la ecuación y el ajuste depende del nivel del factor de regularización utilizado.

Non- Negative Least Squares (NNLS)

En el algoritmo NNLS, como su nombre lo indica, se impone la restricción de solo considerar los valores positivos del ajuste, teniendo en cuenta que son estos los únicos valores con interpretación física. Matemáticamente se basa en minimizar de forma iterativa el coeficiente de ajuste χ^2 de la siguiente expresión:

$$\chi^2 = \sum_{j=1}^N [g(\tau_j) - \sum_{i=1}^M b_i \exp(-\Gamma_i \tau_j)]^2 \quad (17)$$

Si bien la restricción disminuye la cantidad de soluciones posibles, igualmente se necesitan de una gran cantidad de datos para obtener un buen ajuste.

En la práctica, para obtener un buen ajuste de resultados se utilizan hoy día ambos métodos CONTIN y NNLS dependiendo de la muestra. En general se sugiere utilizar el primero para muestras polidispersas con distribuciones monomodales y el segundo para distribuciones multimodales³⁵.

Interpretación de los datos experimentales

La forma de la función de autocorrelación para una solución monodispersa (Figura 7) muestra, para el caso de partículas de tamaño grande, que el tiempo en que la señal

permanece correlacionada es mayor lo cual se traduce en una zona inicial constante por más tiempo, mientras que para el caso de partículas pequeñas la caída exponencial ocurre rápidamente. Por su parte si se observa que aparecen más de un cambio de concavidad, se lo asocia a presencia de algún contaminante o a una muestra polidispersa.

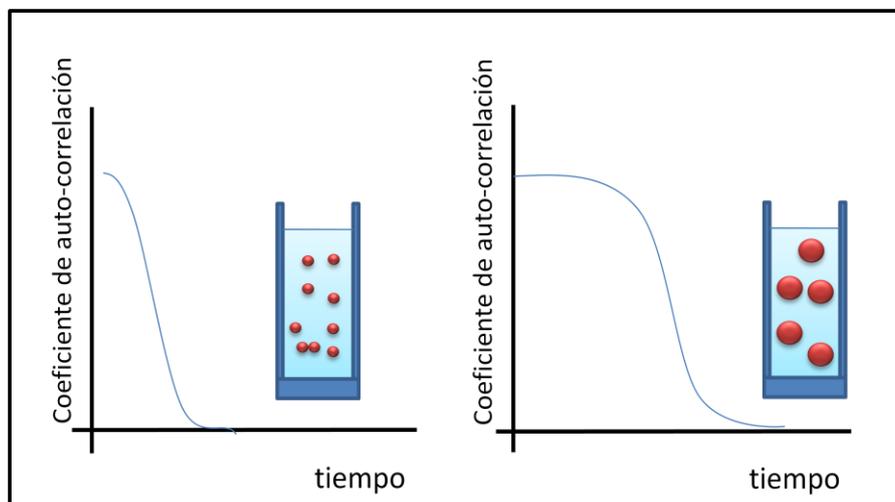


Figura 7: La función de autocorrelación brinda información sobre el tamaño de las partículas dado que para partículas grandes la velocidad de fluctuación es menor y por consiguiente hay que esperar más tiempo para que el valor de correlación decaiga a 0.

El equipo de DLS es capaz de cuantificar en tiempo real la cantidad de fotones que llegan al detector por segundo, el cual a su vez es proporcional a la concentración de partículas presente en la muestra. Este gráfico si bien no brinda información alguna sobre el tipo de partículas es útil a la hora de evaluar si las medidas se realizan correctamente. En términos generales es aconsejable tener recuentos entre 100 y 200 kcps para obtener buenos resultados. Además es importante que el gráfico de recuento vs. tiempo sea lo más estable posible. Si por el contrario existiera interferencia por partículas de polvo, éstas se revelarían en el gráfico como picos puntuales que aparecen de forma aleatoria a lo largo del gráfico. La presencia de estas señales se debe a que en esencia las partículas de polvo tienen un tamaño elevado y por tanto si se interponen en el camino del laser, el aporte a la dispersión de luz es grande en comparación con las partículas pequeñas. Por su parte, si se observan fluctuaciones pronunciadas en el gráfico es indicativo de la presencia de gradientes de

temperatura, por lo cual hay que dejar la muestra más tiempo hasta para que se alcance el equilibrio térmico. Por último, en caso de observar una rampa de subida en el número de recuento o una rampa de bajada, puede ser que se estén generando procesos de agregación y sedimentación respectivamente (Figura 8)³⁵.

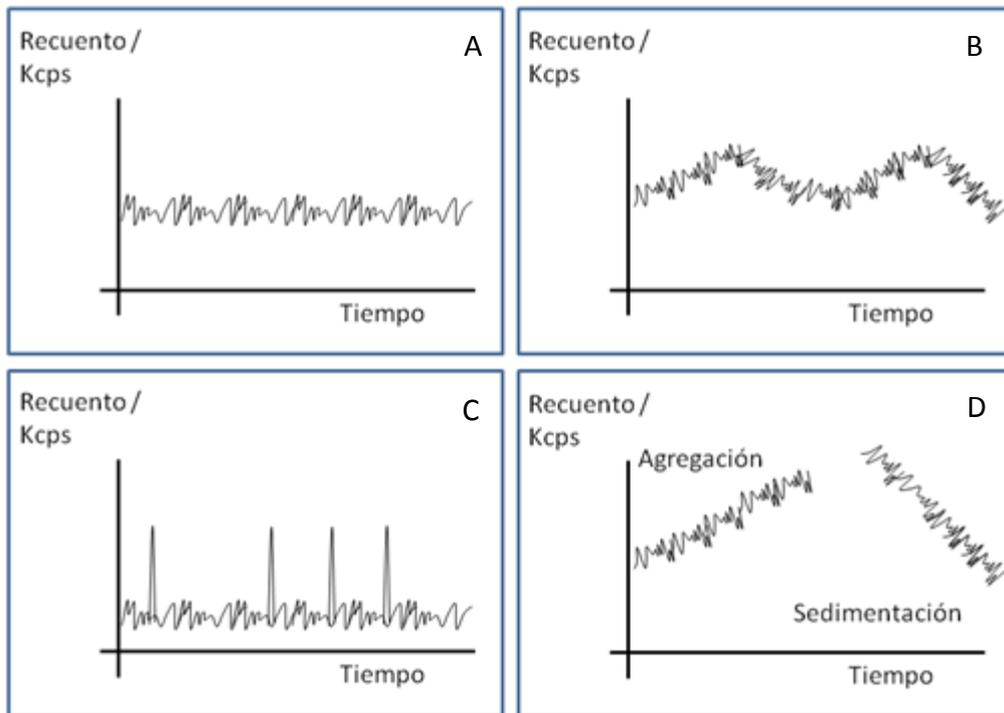


Figura 8: Esquema de los distintas formas que puede adoptar el gráfico de recuento de señales vs. tiempo. Registro normal (A), Efecto de la existencia de un gradiente de temperatura (B), Efecto de la presencia de partículas de polvo (C), Efecto de la presencia de agregados coloidales o sedimentación de las partículas (D).

Gráficos de distribución

Los algoritmos CONTIN y NNLS, permiten calcular la distribución de tamaños de partículas, la cual se representa, en ambos métodos, en un gráfico de intensidad vs. diámetro. Es importante destacar que la sensibilidad del equipo de DLS para distinguir poblaciones de partículas solamente es posible para muestras que presentan poblaciones bien diferenciadas de tamaño dado que los cálculos definen curvas de tipo log normal con un ancho medio de pico considerable.

El valor de intensidad es mayor para las partículas grandes, dado que por su tamaño, pueden dispersar más la luz. Para determinar la población mayoritaria de partículas se debe

realizar una corrección de los valores de intensidad ponderándolos de acuerdo al tamaño del coloide, incorporando las ecuaciones de Mie y las propiedades ópticas de las partículas, como el índice de refracción. Los equipos de DLS hacen estos cálculos de forma automática representando el resultado en un gráfico de número vs. tamaño. Para muestras uniformes, monodispersas, el valor indicado en el gráfico de número debería coincidir al determinado con el método de cumulantés. También el pico del gráfico de número debe coincidir con al menos un valor máximo del gráfico de intensidad

Sumado al gráfico de número, también existe el gráfico de volumen y el gráfico de superficie (que permite determinar la distribución de población en función del volumen y el área de las partículas respectivamente). Estas medidas también requieren del conocimiento previo de las propiedades ópticas de las partículas, y se asume que todas presentan la misma densidad y una forma esférica.

Calibración y validación del equipo

La determinación del tamaño de las partículas por DLS está basada en principios absolutos y por tanto no es posible, ni resulta necesaria, ninguna medida de calibración. Sin embargo, todos los fabricantes proveen una muestra estándar para validar que todo el equipo se encuentre midiendo correctamente. El estándar más utilizado se compone de dispersiones de esferas de látex de poliestireno monodisperso de un tamaño promedio de partícula de 92 nm y un índice de polidispersión menor a 0.1. Alternativamente, se pueden emplear proteínas puras cuyos diámetros hidrodinámicos son bien conocidos.

Consejos y limitaciones prácticas de la técnica de DLS

Si bien la técnica tiene un amplio rango de aplicaciones en diferentes áreas, es importante mencionar las limitaciones desde el punto de vista práctico, así como también algunos consejos útiles a tener en cuenta si se quiere obtener resultados reproducibles y confiables.

La primera regla de oro en un DLS es reconocer al **polvo como el mayor enemigo**. Pequeñas cantidades de polvo del ambiente evita toda posible correlación con las partículas que se quiere medir. El efecto de la presencia de polvo en la solución a medir es equivalente a medir una solución de mezcla de coloides o bien puede que incluso apantallen por completo la información de las partículas coloidales medidas y que nuestro registro termine midiendo

simplemente el polvo del ambiente. Para evitar la contaminación es que se utilizan filtros de 45 μm o 22 μm , dependiendo del tamaño de las partículas en la muestra. Naturalmente es importante elegir un filtro correcto que no sea capaz de filtrar el coloide que queremos medir. Sobre este punto vale aclarar que los filtros comerciales en su gran mayoría no son perfectos. El tamaño de poro reportado por el fabricante siempre representa un tamaño promedio, por lo que si no se quiere perder nada de la muestra, es preciso elegir un tamaño de al menos un orden mayor al de nuestras partículas. Una forma rápida de observar si existe contaminación por polvo mediante el gráfico de número de conteos por segundo en función del tiempo de medida. En este último se observa que en presencia de polvo aparecen saltos grandes en la señal ³⁵.

Como regla general las partículas de tamaño superior a una micra tienden a precipitar, por lo que complementariamente al filtrado, se puede hacer una pequeña centrifugación a velocidad baja de manera de aumentar el tiempo de sedimentación de las partículas grandes como el polvo.

Preparación de la muestra

La elección de la concentración óptima para trabajar con el DLS es un aspecto importante a tener en cuenta, si bien en teoría las fluctuaciones en la intensidad de luz dispersada no dependen de la cantidad de partículas, en la práctica existen concentraciones de trabajo óptimas a tener en cuenta, que dependerán de cada muestra. Como regla general la experiencia dicta que conteos de entre 100 a 300 kcps son suficientes para obtener una buena medida en un tiempo razonable (rango habilitado: 5 – 1000 kcps). Por debajo de estos valores, se deberán realizar más medidas para poder tener el peso estadístico suficiente, si se requiere cierto grado de precisión. Por el contrario si la muestra se encuentra muy concentrada, pueden ocurrir fenómenos no deseados como la restricción de la difusión, en donde la interacción entre las partículas dificulta el movimiento browniano de las partículas. Además puede ocurrir la difusión de arrastre, en donde frente a una concentración elevada, las partículas aparentan tener un tamaño mayor debido a que migran demasiado juntas; o bien también puede que ocurra una dispersión múltiple que se traduce en distribuciones de tamaño mayores a las reales, con tamaños de partículas

menores. La norma ISO 13321:1996 establece que la muestra debe ser translúcida y sugiere que la absorbancia no debe superar las 0.04 unidades.

Por otro lado, es importante dejar un tiempo de reposo suficiente, para que la temperatura llegue al valor deseado, para la estabilización del laser y para alcanzar el régimen de movimiento browniano de las partículas. La norma ISO 13321:1996 sugiere comenzar a medir luego de media hora del prendido del equipo y 10 min luego de depositar la muestra en el instrumento. Diferencias de 1°C respecto al valor de temperatura deseado generan un 2% de error en las medidas de tamaño.

Por otro lado es necesario conocer de antemano el espectro de absorción de la muestra, dado que todos los equipos trabajan con una fuente laser, cuya longitud de onda se encuentra en el visible. Si la muestra presenta absorción de luz a la misma longitud de onda del laser no será posible obtener medidas fiables. De la misma forma si la muestra presenta fluorescencia, no será apta para su medida por esta técnica. En general los equipos disponen de monitores que advierten tales fenómenos, sin embargo basta con visualizar el gráfico de correlación para darnos cuenta si la medida no es posible, dado que en ambos casos no se observará una respuesta sigmoidea.

Debido a que las medidas por DLS se basan en la ecuación de Einstein-Stokes (Ec.6), es necesario conocer la viscosidad de la solución. En general si la muestra se encuentra lo suficientemente bien diluida alcanza con conocer la viscosidad del solvente, para los demás casos se deberá medir de antemano el valor de la viscosidad de la muestra. Si se trabaja a diferentes temperaturas, es importante recordar que la viscosidad también depende de la temperatura, pudiendo en algunos casos afectar significativamente la medida.

1.4 Espectroscopía infrarroja (FTIR)

La espectroscopía infrarroja es una técnica de análisis cualitativo y cuantitativo aplicada a diversas disciplinas, que van desde la farmacéutica, la química de los materiales, la industria alimenticia, etc. Se basa en la absorción de luz en la región infrarroja del espectro electromagnético (Figura 9).



Figura 9: Espectro electromagnético. En rojo se representa la región infrarroja comprendida entre 700 – 1000 nm.

La absorción de luz infrarroja se asocia a movimientos vibracionales característicos de ciertos grupos funcionales presentes en una molécula. El modelo clásico que explica estos fenómenos se basa en el modelo molecular de átomo-resorte, donde el último representa el enlace entre los mismos (Figura 10). Si bien este modelo representa es un esquema simplificado del fenómeno (en contraposición con la teoría cuántica), de cualquier manera aún sigue siendo útil para explicar y predecir ciertas propiedades, al tiempo que facilita enormemente la comprensión del mismo.

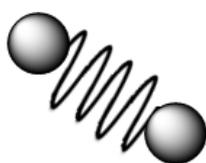


Figura 10: Esquema del modelo clásico de bola-resorte, para la interpretación de las interacciones entre los átomos. Cada esfera representa un átomo y los resortes representan el enlace químico entre ellos.

Cuando se irradia luz infrarroja a una molécula, esta absorbe energía por medio de la vibración del enlace, lo cual siguiendo el modelo, se traduce en la oscilación del resorte, que vibrará con una frecuencia que se calcula de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\nu_0 = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (23)$$

$$\frac{1}{\mu} = \frac{1}{m_1} + \frac{1}{m_2} \quad (24)$$

donde μ representa la masa reducida de los átomos de masa m_1 y m_2 y la constante del resorte k se relaciona con la rigidez del enlace.

Algunas predicciones válidas del modelo son:

- ❖ Cuanto más fuertes y rígidos sean los enlaces (mayor la constante del resorte), mayores serán las frecuencias de vibración absorbidas y viceversa.
- ❖ Las masas atómicas menores tienden a originar frecuencias de absorción mayores.

No todas las vibraciones atómicas son capaces de absorber luz infrarroja, esto se conoce como la "regla de selección", la cual establece que para que una molécula sea visible en el infrarrojo, el momento dipolar de la misma debe cambiar durante la vibración. En consecuencia, la interpretación de las señales de absorción dependerá de la forma de vibración de las moléculas, que formalmente reciben el nombre de modos normales de vibración³⁶. Las reglas de selección surgen de la aplicación de los principios de mecánica cuántica.

La interacción de luz infrarroja con la materia puede ser entendida en términos de cambios en el momento dipolar asociados con las vibraciones y rotaciones de los átomos presentes. Para una molécula diatómica, la cantidad de modo de vibración es de dos, siendo que o bien pueden acercarse un átomo hacia el otro (*stretching*) o bien pueden moverse hacia fuera del plano que contiene ambos átomos con su enlace (*bending*). Si generalizamos estos conceptos para un número N de átomos en una molécula no lineal se tiene 3 N grados de libertad con tres movimientos de traslación y 3 movimientos de rotación, y 2 movimientos de rotación para una molécula lineal. Esto deja 3 N - 6 y 3 N - 5 modos de vibración para una molécula no lineal y lineal respectivamente. Luego de todas las posibles vibraciones se evalúa cuál de ellas serán activas en el infrarrojo de acuerdo con las reglas de selección. La Figura 11 muestra los distintos tipos de vibraciones posibles.

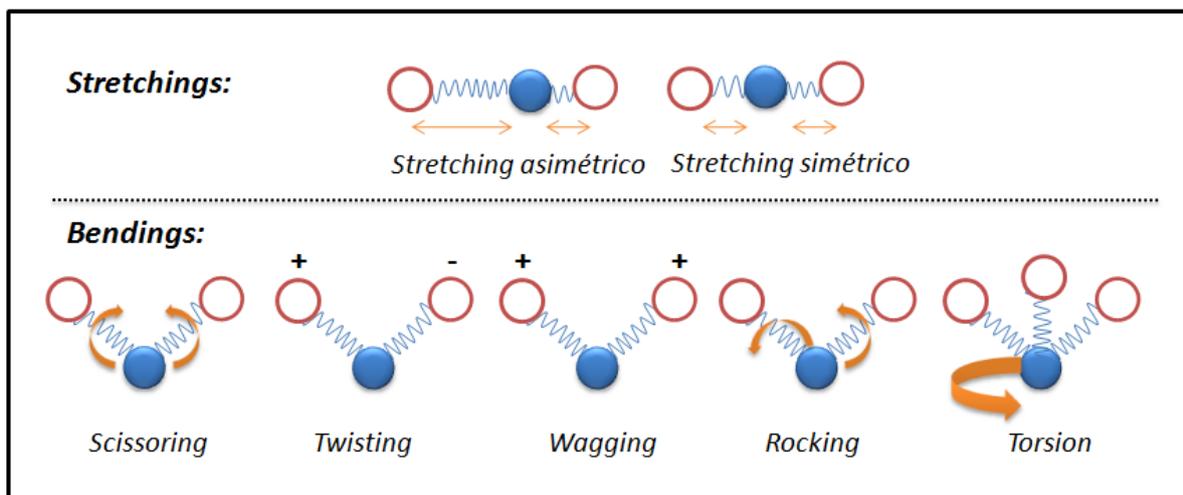


Figura 11: esquema de los distintos modos vibracionales de los átomos en el espacio.

A diferencia de los espectros de UV-Visibles, los gráficos de espectroscopía infrarroja aparecen graficados como transmitancia o absorbancia vs. número de onda, en lugar de longitud de onda. La única razón de esta convención es que el número de onda varía de forma lineal con la energía y por tanto facilita utilizar esta magnitud dado que el proceso de obtención del espectro difiere sustancialmente de un espectro de UV-Vis³⁶.

$$\nu = \frac{1}{\lambda} = \frac{\nu}{c} = \frac{E}{hc} \quad (25)$$

donde ν es el número de onda, ν es la frecuencia h es la constante de Planck (6.626×10^{-34} J s)²⁵ y E es la energía del haz de luz.

El análisis de un gráfico del espectro infrarrojo puede dividirse en dos partes (Figura 12). Por un lado se ubica la región llamada de "huella dactilar" desde los 400 a los ca. 1200 cm^{-1} donde se presentan un gran número de bandas, la mayoría de ellas producto de modos vibracionales acoplados de diferentes grupos funcionales que componen las moléculas presentes en la muestra. Debido a su gran complejidad y a que pequeñas variaciones en los átomos de una molécula producen cambios significativos, los patrones de señales observadas son característicos de cada sustancia, por lo que se utiliza fundamentalmente para la caracterización y/o identificación de compuestos. Por encima de los ca. 1200 cm^{-1} las bandas observadas aportan información sobre los grupos funcionales presentes.

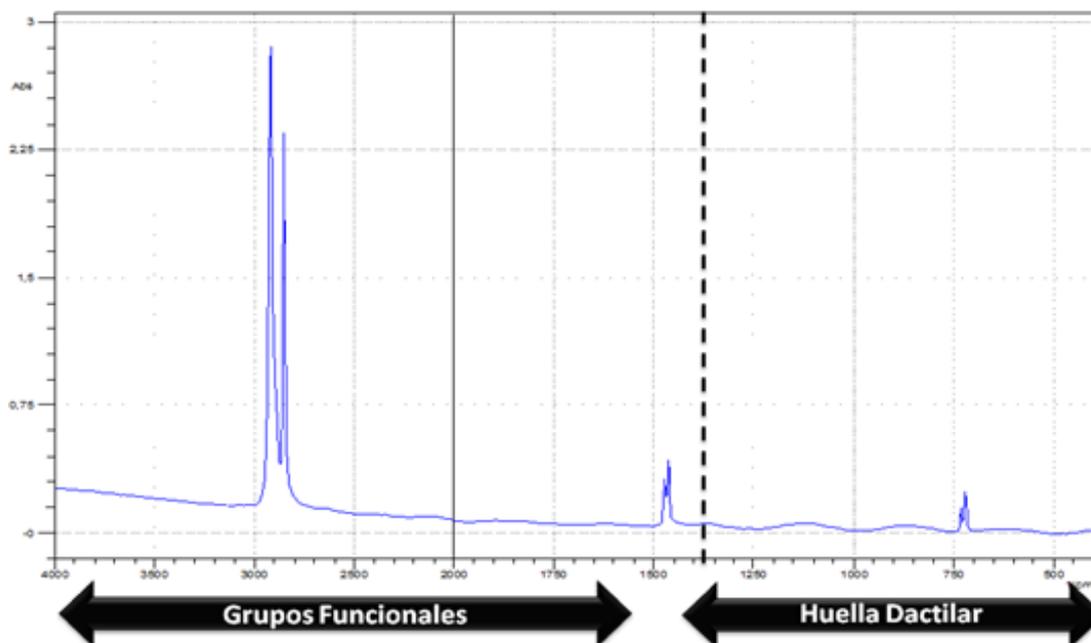


Figura 12: Espectro infrarrojo de una muestra de polietileno. Por debajo de los 1200 cm^{-1} se encuentra la zona de "huella dactilar" y por encima se distingue la región útil para la identificación de grupos funcionales. En este caso particular, las señales a 2900 cm^{-1} se corresponde con el modo *stretching* de vibración de los enlaces C-H.

La Figura 13 muestra el espectro de absorción del aire. Las señales que aparecen se adjudican al vapor de agua y al anhídrido carbónico presente en la atmósfera. La presencia de múltiples picos para el caso de la absorción de luz infrarroja por parte de las moléculas de agua obedece a varios factores que fundamentalmente se observan en muestras gaseosas: El efecto Doppler, que causa la aparición de múltiples bandas ligeramente corridas en frecuencia y por tanto en longitud de onda, los efectos generados por la colisión de las moléculas y otros factores cuánticos son las principales causas de ensanchamiento y aparición de varias bandas en el espectro del aire. En general este espectro se toma como blanco en las medidas de rutina, sin embargo si se trabaja con muestras más complejas pueden purgarse los gases presentes.

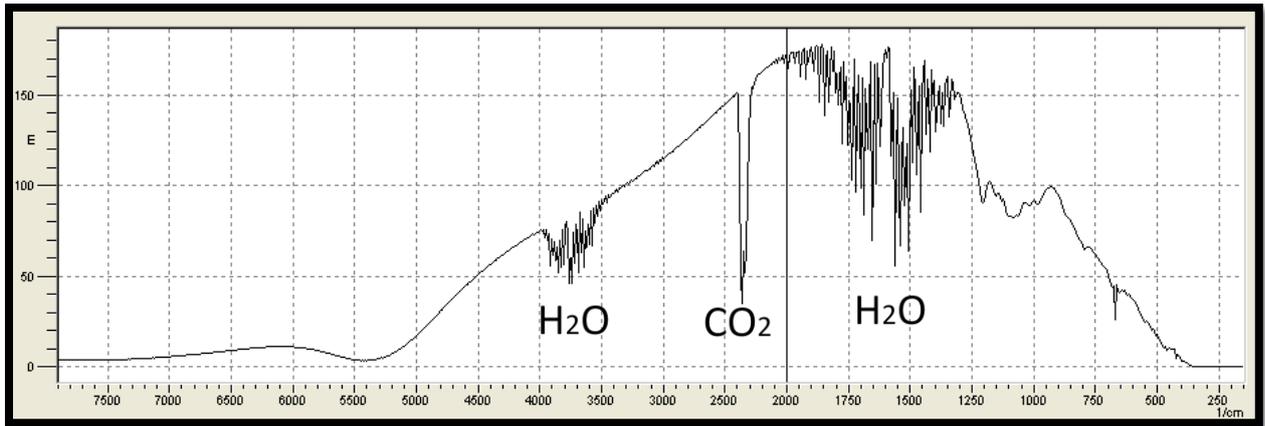


Figura 13: Espectro de absorción del aire.

Fundamento de la técnica de FTIR

Si bien los espectros de infrarrojo se visualizan como medidas de transmitancia o absorbancia, a diferencia de la espectroscopía tradicional (UV-Vis-NIR) estas medidas no se obtienen de manera directa, sino que a través del interferograma formado por los haces de luz infrarroja que atraviesan la muestra. El diseño de la técnica se basa en el uso de un interferómetro de Michelson, compuesto por un espejo móvil un espejo fijo y un espejo semitransparente (*beam splitter*) (Figura 14).

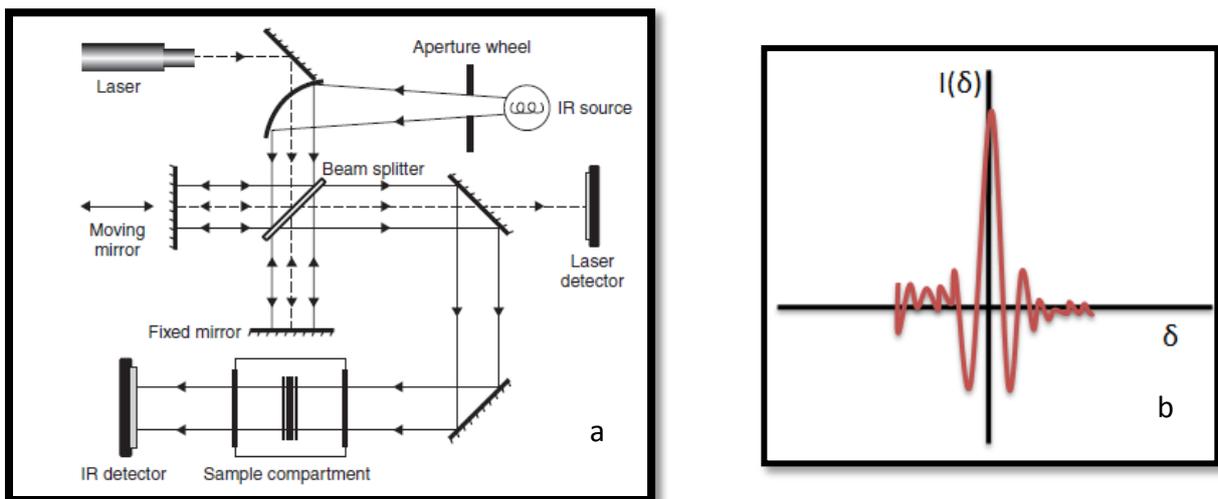


Figura 14: Esquema del funcionamiento del interferómetro de Michelson (a). Forma del interferograma obtenido bajo la forma de intensidad vs. camino óptico (δ) para una fuente de luz policromática (b). A partir del interferograma se realiza una transformada de Fourier para obtener como resultado el espectro de absorción.

La luz infrarroja emitida por la fuente atraviesa un espejo semitransparente de manera que el 50 % de la luz se refleja en dirección del espejo estacionario, mientras que el otro 50 % se transmite hacia el espejo móvil (Figura 14a), para luego converger ambos en una misma dirección hacia a la muestra. El espejo móvil genera que el camino óptico de cada haz sea diferente y por tanto ambos haces se superponen con un cierto desfase, generando un patrón de interferencia. Para una fuente de luz monocromática el patrón de interferencia representado como intensidad vs. camino óptico es la función coseno, mientras que para una fuente de luz policromática la función resultante es la suma de todas las funciones monocromáticas que la componen (Figura 14b). Dado que las muestras absorben luz a distintas longitudes de onda, la forma de los interferogramas de salida contiene toda la información del espectro de absorción de la muestra.

La manera de interpretar la información contenida en los interferogramas es calculando los espectros de absorción, mediante la transformada de Fourier. Esta última es una función que permite calcular la intensidad de luz para cada longitud de onda (o número de onda) a partir de la suma contenida en el interferograma. Matemáticamente puede expresarse como el par de Fourier:

$$I(x) = \int_0^{\infty} S(v) \cos(2\pi vx) dv \quad (26)$$

donde $I(x)$ corresponde a la intensidad de luz vs. la diferencia del camino óptico, y

$$S(v) = \int_0^{\infty} I(x) \cos(2\pi vx) dx \quad (27)$$

donde $S(v)$ corresponde a la función de intensidad para cada número de onda v , es decir el espectro de absorción. El cociente entre el espectro de medida sobre el espectro blanco define el espectro de la muestra expresado en transmitancia.

La aplicación de la transformada de Fourier presenta el problema práctico de una integración entre cero e infinito, lo cual es imposible ya que supondría el movimiento del espejo en un rango infinito. De esta forma la integración se realiza en un intervalo finito $[-L, L]$. Luego la expresión de la transformada puede expresarse como:

$$S(v) = \int_0^{\infty} W(x) I(x) \cos(2\pi vx) dx \quad (28)$$

donde $W(x) = 1 \forall x/|x| \leq L$ y $W(x) = 0 \forall x/|x| > L$

La introducción de la función $W(x)$ genera que el interferograma se observe con ondulaciones adicionales, lo cual se traduce en un espectro con bandas falsas de transmitancia.

Matemáticamente la contribución de $W(v)$ sobre el interferograma puede calcularse como:

$$W(v) = \int_0^{\infty} W^2(x) \cos(2\pi vx) dv = \int_{-L}^L \cos(2\pi vx) dv = \frac{2L \sin(2\pi vL)}{2\pi vL} \quad (29)$$

En otras palabras los espectros presentan bandas de intensidad reales dados por $S(v)$ y bandas ficticias por $W(v)$. Para solucionar este problema se utilizan artificios matemáticos que minimizan los errores introducidos por $W(v)$. Estos reciben el nombre de apodizaciones.

Apodizaciones

La apodizaciones son funciones matemáticas que se introducen a la transformada de Fourier como alternativas a la función $W(x)$ de manera que permiten integrar correctamente en el rango finito de caminos ópticos, minimizando las ondulaciones accesorias del interferograma. Algunas de estas funciones, si bien previenen la visualización de bandas falsas de transmitancia, tienen como contrapartida pérdidas de resolución. La función Happ-Genzel es la apodización más utilizada, ya que presenta un buen compromiso entre resolución y ruido. La Tabla 2 lista las diferentes funciones de apodización más comunes.

Tabla 2: Funciones de apodización. Actualmente la más utilizada es la función Happ-Genzel.

Apodización $ x \leq L$	Transformada de Fourier
<i>Box-car</i>	1
<i>Triangular</i>	$1 - \frac{ x }{L}$
<i>Happ-Genzel</i>	$0.54 + 0.46 \cos\left(\frac{\pi x}{L}\right)$
<i>Cosine(Cos)</i>	$\cos\left(\frac{\pi x}{2L}\right)$
<i>Lorenz</i>	$\exp\left\{-\frac{ x }{L}\right\}$
<i>Gaussian</i>	$\exp\left\{-\left(\frac{2.24x}{L}\right)^2\right\}$

Preparación de las muestras

Una de las aplicaciones generales más importantes de la espectroscopía infrarroja es la medida de muestras en fase sólida. Existen diferentes técnicas dependiendo del rango del espectro buscado y de la naturaleza de la muestra a analizar. El método más explotado es el uso de discos o pastillas de haluros alcalinos como es el caso del bromuro de potasio (KBr). El método de medida consiste en la fabricación de una pastilla de KBr conteniendo una pequeña fracción de la muestra de análisis. Utilizando un mortero de ágata, el KBr se mezcla con la muestra a analizar (usualmente en un 1% m/m del total de KBr utilizado). Luego la mezcla sólida resultante se somete a una presión de 10 toneladas durante 2 minutos generando un disco transparente. Existen varias precauciones a tener en cuenta en la fabricación de las pastillas. Primero que nada el KBr es soluble en agua, por lo que el primer cuidado consiste en conservar la sal en un ambiente seco, generalmente dentro de un desecador o de la propia estufa. Asimismo es recomendable que la humedad ambiente no ser demasiado alta, o contar con algún sistema de vacío, de lo contrario las pastillas serán débiles y se romperán fácilmente.

Otro factor es la cantidad de muestra necesaria. Masas de 2 a 3 mg en 200 mg del haluro son suficientes para obtener un buen espectro de medida. Es importante que los discos no

sean ni muy gruesos ni muy finos, lo recomendable es aproximadamente 1 mm de espesor. El tamaño de los cristales de la muestra no puede ser muy grande, especialmente para medidas a altos números de onda, donde la dispersión de luz se incrementa por el efecto de Christiansen.

Si bien la pastilla de KBr es la manera usual de medir compuestos sólidos, gracias a que brinda un amplio rango de medida ($400\text{-}5000\text{ cm}^{-1}$), baja reactividad y estabilidad, en algunos casos particulares su uso no es posible, por lo que en su lugar otras sales deben ser empleadas (cloruro de plata, cloruro de potasio o ioduro de Cesio). El ioduro de Cesio es particularmente útil para medir en la región entre $250\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ donde la pastilla de KBr no es transparente.

Durante mucho tiempo el KBr era utilizado en la amplia mayoría de las muestras analizar. Sin embargo, partir de la 14ª edición de la Farmacopea Japonesa fueron publicados varios casos donde el reactivo es capaz de interactuar con la muestra dando lugar a bandas de absorción que no son propias de la muestra. Este es el caso de los clorhidratos. La Figura 1 muestra los espectros superpuestos de la L-hidrocloruro de cisteína medidos en pastilla de KBr y KCl. Los espectros muestran la aparición de una Banda a ca. 800 cm^{-1} y un corrimiento de la banda a 775 cm^{-1} ³⁷.

En algunos casos la naturaleza de la muestra no permite fabricar una pastilla, el sólido puede ser medido en suspensión siguiendo el método *mull*. La técnica consiste en morterear el sólido y resuspenderlo (alrededor de 50 mg) en una o dos gotas de agente mull, hasta obtener una pasta homogénea. El agente más utilizado es el Nujol (parafina líquida). Al igual que con los métodos de pastilla, la cantidad de muestra es clave a la hora de obtener un buen espectro, es necesario que la pasta formada tenga la cantidad de muestra y el espesor adecuado y se deben minimizar los efectos de dispersión de luz mortereando bien los cristales del analito. El Nujol permite medir muestras en un rango de $200\text{ a }4000\text{ cm}^{-1}$ aunque presenta dos bandas de absorción alrededor de ca. 1400 cm^{-1} y otra alrededor de 2800 cm^{-1} .

Para las medidas en fase líquida se utilizan dos clases de transmisión: fijas y desmontables. Las primeras son utilizadas, para medidas cuantitativas de líquidos volátiles, pero presentan

la desventaja de ser de difícil limpieza. Las celdas desmontables están constituidas por un soporte, dos ventanas de algún material transparente al infrarrojo (Tabla 3) y un separador generalmente de polytetrafluoroetileno (teflón), cuyo tamaño depende de la medida a realizar. La principal ventaja de este tipo de celdas está en el pulido de las ventanas, lo cual mejora significativamente la limpieza de la celda luego de su uso. El principal inconveniente es la necesidad de determinación previa del camino óptico o ancho de la celda, el cual varía ya sea por problemas de ajuste del soporte, por desgaste del separador y/o el pulido de la ventana. Esto es especialmente importante en el análisis cuantitativo, donde de acuerdo con la Ley de Bouguer-Beer la absorbancia es igual al producto del camino óptico por la absorptividad molar y la concentración de la muestra.

Tabla 3: Principales ventanas utilizadas en celdas de infrarrojo.

Ventana	Rango (cm ⁻¹)	Índice de refracción	Propiedades
NaCl	40 000-625	1.52	Soluble en agua, levemente soluble en alcohol, bajo costo, alta resistencia mecánica y de shock térmico, se empaña.
KCl	33 000-400	1.50	Similar al NaCl, menos soluble.
KBr	40 000-400	1.53	Soluble en agua y alcohol, levemente soluble en éter, higroscópico, bajo costo, alta resistencia mecánica y de shock, térmico, se empaña.
CaF ₂	77 000-1 110	1.42	Insoluble en agua, resistente a la mayoría de los ácidos y bases, resistente a altas presiones, no se empaña.
BaF ₂	67 000-740	1.46	Insoluble en agua, soluble en ácidos y en cloruro de amonio, material quebradizo, no se empaña.

La dificultad principal en el trabajo con muestras en fase acuosa es la propia absorción de luz infrarroja por parte de las moléculas de agua, lo cual reduce el rango de números de onda útiles de medida. Este problema puede ser resuelto en parte mediante el uso de agua pesada. El agua deuterada (D₂O) presenta sus máximos de absorción corridos con respecto al agua común debido a que la frecuencia de vibración de los enlaces depende de la masa de los átomos. Adicionalmente es necesario el uso de separadores cortos (~ 0.010 mm) de manera de minimizar la absorción del agua.

Alternativamente, para el análisis **no cuantitativos**, medidas rápidas en fase líquida pueden ser obtenidas a partir del *método sandwich*, donde simplemente se coloca una gota de solución entre dos ventanas. Este método tampoco es útil para compuestos volátiles con un punto de ebullición menor a 100°C.

Procesamientos de los espectros

- **LÍNEA DE BASE:** En el análisis cuantitativos es uno de los aspectos principales a cuidar. En general la línea de base se construye uniendo simplemente los puntos de menor absorbancia de las porciones planas del espectro.
- **SUAVIZADO:** El ruido en un espectro puede ser reducido mediante el suavizado de las señales. El resultado es similar a reducir la resolución. Existen básicamente dos tipos de algoritmos comúnmente utilizados: *Adjacent Averaging* y *Savitzky-Golay*. El primero, más simple, hace lo que su nombre indica. El segundo se basa en la regresión local de los puntos de la ventana elegida a un polinomio de grado n , dando como salida el valor calculado a partir del polinomio.
- **RESTA DE ESPECTROS:** Una de las herramientas más utilizadas para observar señales es la diferencia de espectros. Esto permite visualizar señales que de otro modo pudieran estar ocultas por la presencia de absorciones de diferentes compuestos. En especial, en las medidas en solución es necesario restar el solvente. Sin embargo, se debe tener cuidado a la hora de procesar los resultados, ya que la mayoría de los casos la concentración de solvente sólo es mayor que la del solvente y la muestra problema, por lo que bandas negativas pueden aparecer en la región de absorción del espectro. La diferencia de espectros es también especialmente útil en el análisis de espectros con la técnica de *mull*.
- **DERIVACIÓN:** Existen dos ventajas al derivar las bandas. Por un lado, se aumenta la resolución, dado que la derivada segunda de la función da como resultado picos negativos para cada banda y hombro del espectro.
- **DECONVOLUCIÓN:** La técnica de deconvolución permite observar las diferentes contribuciones que forman una determinada banda de absorción. Esta técnica es especialmente útil en el análisis de la estructura secundaria de las proteínas.

1.5 Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM)

El origen de la nanociencia se encuentra estrechamente vinculado a la historia del microscopio electrónico de barrido (TEM). La razón básica es que la técnica permite la visualización directa de las partículas a la escala nanométrica.

Fundamentos de la técnica

Si bien tiempo atrás se conocía las propiedades particulares de las nanoestructuras, no fue hasta mediados del siglo XX cuando comenzó a crecer un interés particular llegando actualmente a una especie de moda del “mundo nano” o como algunos autores prefieren llamar la era de la “nano manía”³⁸.

La razón principal del salto se deba probablemente al desarrollo de nuevas tecnologías que permitieron observar directamente al “mundo nano” antes oculto. Entre toda la lista de herramientas nuevas, quizás la más significativa sea la invención del microscopio electrónico de transmisión (TEM).

El TEM, es un instrumento de alta resolución, basado en el uso de un haz de electrones acelerados, en lugar de la luz, como en los microscopios convencionales.

Origen del TEM

El TEM surge como resultado del desarrollo de la mecánica ondulatoria hacia la primera parte del siglo XX. La superioridad sobre los microscopios ópticos convencionales se basa en su alto poder de resolución (R) que de acuerdo con Ernest Abbe, se define como la distancia mínima detectable entre dos puntos de una imagen:

$$R = K \frac{\lambda}{n \sin \alpha} \quad (30)$$

donde K es una constante que depende de las características propias del aparato, λ es la longitud de onda de la radiación iluminante con la que se forma la imagen, n representa el índice de refracción del medio situado entre la muestra y el objetivo, y α es el ángulo de apertura, definido entre el objetivo y el objeto de observación. De acuerdo con la ecuación de Abbe, si se quisiera aumentar el poder de resolución de un microscopio óptico habría

que disminuir el numerador y/o aumentar el denominador. En el primer caso la mejora máxima en la resolución queda limitada al uso de la menor longitud de onda del rango visible del espectro correspondiente al color violeta a 400 nm. Para aumentar el denominador habría que, o bien incrementar el índice de refracción del medio entre la lente objetiva y el objeto, o bien el aumentar el seno del ángulo α . El índice de refracción una vez que se elige la sustancia óptima queda como una variable fija. Por su parte, el incremento del ángulo se puede lograr aumentando el diámetro de las lentes y/o reduciendo la distancia focal de los objetivos ³⁹⁻⁴⁰.

Hasta la primera década del siglo XX la microscopía parecía haber llegado a su límite de resolución, dado que las continuas mejoras en las lentes habían alcanzado el valor máximo compatible con la observación de las muestras biológicas. Durante los primeros 30 años del siglo XX se desarrollaron una serie de trabajos teóricos y experimentales que dieron vida al TEM ⁴¹:

- 1924: De Broglie estudia las propiedades ópticas de un haz de electrones acelerados.
- 1926: Busch logra construir lentes para haces de electrones. Seis años más tarde de la mano de Brüche, Johannson, Knoll y Ruska se comienzan a construir los primeros prototipos del TEM.
- 1934: Ruska logra por primera vez superar al microscopio óptico y dos años más tarde consigue mejorarlo, alcanzando resoluciones de 10 nm.
- 1946: Hillier y Ramberg desarrollan un corrector del astigmatismo, obteniendo resoluciones de 0.6 nm.

En los años posteriores la técnica se siguió mejorando, lográndose en la actualidad resoluciones de hasta 0.15 nm ³⁹.

El fundamento del gran poder de resolución del microscopio óptico se basa en la disminución del valor de longitud de onda en la ecuación de Abbe. De acuerdo con la ecuación de De Broglie, la longitud de onda de un haz de electrones es inversamente proporcional a la cantidad de movimiento p del electrón:

$$\lambda = \frac{h}{p} = \frac{h}{mv} \quad (31)$$

donde λ es la longitud de onda del haz de electrones, h es la constante de Planck, y la cantidad de movimiento es el producto de la masa m y la velocidad v del electrón.

El TEM utiliza un haz de electrones acelerado mediante una diferencia de potencial que varía entre 50.000 y 120.000 V. Cuanto mayor es el voltaje de aceleración mayor es la velocidad de los electrones y en consecuencia menor es la longitud de onda del haz. A modo de ejemplo, con potenciales de 100 kV se obtiene una longitud de onda de 0.0037 nm, la cual es aproximadamente 100.000 veces menor que la luz visible. Si bien el haz de electrones permite aumentar considerablemente el poder de resolución, a diferencia del microscopio óptico, las lentes magnéticas del TEM requieren de ángulos de aperturas pequeños para minimizar las distorsiones causadas por aberraciones de la lente. De cualquier manera en el balance neto, el poder de resolución del microscopio electrónico es 1000 veces mayor al del microscopio óptico^{39,40}.

El funcionamiento del microscopio electrónico de transmisión es análogo al del microscopio óptico, con la salvedad que en lugar de utilizar la luz, utiliza un haz de electrones y en lugar de utilizar lentes de vidrio, utiliza lentes magnéticas y electroestáticas^{39,41-42}.

Los electrones de una fuente entran en la muestra, se dispersan y se enfocan con un lente objetivo. La señal resultante es amplificada proyectándose una imagen de la muestra sobre una pantalla fluorescente. Dichas imágenes se forman porque los distintos átomos de la muestra interactúan y absorben electrones en diferente forma^{39,42}.

Componentes del microscopio electrónico de transmisión

Básicamente un microscopio electrónico está formado por cuatro partes: la “columna” donde se ubican los lentes condensadores y la fuente (o “cañón”) de electrones; un sistema de vacío que mantiene baja la presión dentro de la columna; un sistema de enfriamiento y un dispositivo de registro de imagen^{39,42}.

El cañón está compuesto por un cátodo, formado por un filamento de tungsteno en forma de V rodeado por un cilindro hueco (cilindro de Wehnelt) y un ánodo a potencial nulo. Cuando el tungsteno se calienta en vacío, con una corriente de bajo voltaje, se emiten electrones formando una nube alrededor del filamento. Al aplicar sobre el cátodo un voltaje fuertemente negativo se genera una gran repulsión de los electrones, los cuales se

desplazan coherentemente en dirección del ánodo. Este último posee un orificio que permite que los electrones acelerados continúen su trayectoria hacia las lentes.

El cilindro de Wehnelt rodea completamente al filamento salvo por un pequeño orificio situado frente a la punta de la V de tungsteno. El voltaje del cilindro es ligeramente mayor (en valor absoluto) al voltaje del cátodo y en consecuencia solamente los electrones que se encuentren sobre el orificio serán capaces de seguir la trayectoria hacia el ánodo. Variando la diferencia de potencial entre el cátodo y el cilindro de Wehnelt se puede controlar la intensidad de del haz de electrones. La relación entre la diferencia de potencial, entre el filamento (cátodo) y el cilindro de control, y entre este último y el ánodo, produce un campo electrostático, que tiene las propiedades de una lente convergente. El efecto de cambiar la intensidad del haz de electrones es por analogía similar a cambiar la intensidad de un microscopio óptico.

Existen tres parámetros de control del cañón: el voltaje de aceleración de electrones, la intensidad de haz y la corriente de calefacción del filamento. El aumento del voltaje de aceleración produce una mayor velocidad de los electrones, y por tanto la velocidad del haz aumenta y la longitud de onda disminuye (de acuerdo con De Broglie). En consecuencia el poder de resolución aumenta con el incremento en la diferencia de potencial. En contrapartida, la cantidad de electrones que interactúan con la muestra disminuye y por tanto se pierde contraste³⁹.

La intensidad está asociada con el nivel de brillo de la imagen (a mayor intensidad mayor brillo). Dado que la intensidad depende de la cantidad de electrones que llegan a la muestra, el uso de intensidades altas puede en algunos casos llegar a dañar las muestras durante su observación⁴².

La corriente de calefacción del filamento debe ser la mínima saturante. La saturación es un fenómeno que se produce cuando la cantidad de electrones emitidos por fuente iguala la cantidad de electrones que forman parte del haz. El aumento del calentamiento del filamento por encima del nivel de saturación no genera efecto alguno, más que acortar su vida útil. Por otro lado su disminución baja la intensidad del haz y por tanto el brillo es menor. Valores muy bajos de calefacción del filamento, pueden generar la emisión de electrones con diferentes energías, produciendo aberraciones en la imagen⁴³.

Alternativamente, en algunos microscopios electrónicos modernos, se utilizan filamentos de lantano o de emisión de campo. El primero funciona de la misma forma que el tungsteno pero a diferencia de este, la punta de emisión es mucho más delgada, lo que produce zonas de iluminación más pequeñas, mejorando la nitidez de la muestra. Por su parte, el filamento de emisión de campo consiste en un cilindro metálico al cual se le hace una punta de diámetro menor a $1\ \mu\text{m}$ (generalmente $0.1\ \mu\text{m}$). Esta punta se encuentra en una cámara de vacío y al ser sometida a un fuerte campo eléctrico emite electrones. Mediante esta variante se pueden lograr zonas de iluminación menores a $10\ \text{nm}$, lo cual aumenta significativamente la calidad de la imagen ⁴³.

Para la visualización de la imagen en general se emplean pantallas fluorescentes, las cuales emiten luz cuando el haz de electrones llega a ellas. De esta forma las diferentes intensidades luminosas, generadas por la absorción desigual de los electrones de la muestra, definen la imagen. Las zonas de mayor densidad electrónica impiden el pasaje de luz a través de la muestra observándose de manera oscura, mientras que zonas de menor densidad electrónica aparecen de forma clara.³⁹

Preparación de la muestra

Las medidas de nanopartículas de plata no requieren de una preparación compleja. Alcanza con depositar una gota de una solución en una grilla de cobre-carbono, dejar secar y luego observar directamente en el microscopio. Sin embargo, es importante tener en cuenta ciertos cuidados sobre cuanta cantidad de muestra se agrega, cuánto tiempo se deja secar la gota sobre la grilla y cuál es la concentración de la muestra. La mayoría de los protocolos reportados no hacen hincapié en este tipo de datos, lo cual conlleva en muchos casos en la necesidad de repetir el experimento, ya sea porque se agregó una cantidad excesiva de muestra y por tanto se observa un acumulo enorme de partículas, que no permite distinguir ni la forma, ni el tamaño, ni el estado de agregación; o por el contrario la muestra es escasa y no se alcanza a observar.

Si bien cada sistema es diferente, se puede generalizar que lo recomendable es realizar una deposición en una grilla de Cobre-Carbono, de $10\ \mu\text{L}$ durante $40\ \text{min}$ y partiendo de una solución de nanopartículas cuya absorbancia sea ca. 1. Si bien las absortividades molares de las soluciones y/o la adherencia de las partículas por la grilla pueden variar, en términos

generales la experiencia dicta que las condiciones descritas son suficientes para obtener buenos resultados.

1.6 Difractometría de rayos X en polvo (XRD)

La difractometría de rayos X (XRD) es una técnica versátil aplicada fundamentalmente a la determinación de las estructuras y geometrías moleculares de los compuestos químicos y a la identificación de sustancias, a partir de patrones de difracción característicos que pueden ser utilizados como "huellas dactilares". Dentro del contexto de la nanotecnología, la técnica permite además determinar el tamaño promedio de las cristalitas componentes del material a través del método de Debye-Scherrer⁴⁴.

Fundamento de la técnica

La difractometría se basa en las interacciones entre el haz de rayos X y la materia, dando lugar a una serie de rayos difractados cuyo patrón de interferencia contiene la información referente a las posiciones relativas de los átomos que componen el material en estudio. En otras palabras, si se conoce el patrón de difracción resultante, uno podría en principio construir el camino inverso hasta llegar a las estructuras periódicas de las moléculas que definen las sustancias químicas⁴². Para que esto sea posible, es necesario contar con cristales bien definidos, donde las posiciones relativas de los átomos que componen el cristal se encuentran fijas, de manera que el patrón de difracción resultante sea característico de la sustancia de estudio. Cuando la luz incide sobre una sustancia, los átomos que la componen pueden o bien absorber o bien dispersar la luz. Cuando hablamos de difracción de rayos X, asumimos que la respuesta de salida se compone de un patrón de interferencias destructivas y constructivas producto de los rayos que colisionan con los átomos de forma elástica, es decir, sin cambiar la longitud de onda, puesto que no hay pérdida ni ganancia de energía⁴⁴.

Dado que las distancias interatómicas se encuentran en el rango 0.15 - 0.4 nm, es necesario emplear longitudes de onda de la misma magnitud, ubicándose en la región de los rayos X (0.1 – 10 nm). En general los equipos de difractometría de polvo funcionan empleando la longitud de onda correspondiente a los máximos determinados por el doblete del cobre $K\alpha_1$, $K\alpha_2$ a 1.541 Å⁴⁵.

Los diagramas de difracción consisten en la representación gráfica de la intensidad de los rayos X difractados vs. el ángulo (2θ) del haz incidente, la aparición de un pico da cuenta de

la existencia de un máximo en las interferencias constructivas de los rayos difractados para un ángulo de incidencia dado, definidos por la ley de Bragg⁴⁵:

$$n\lambda = 2d \operatorname{sen} \theta \quad (32)$$

donde n es un número entero, λ representa la longitud de onda de los rayos X y d la separación entre los planos de la red cristalina.

A partir de la Ley de Bragg y considerando los ángulos donde aparecen los máximos en el difractograma, se pueden calcular las distancias entre los planos de difracción definidos por la estructura del cristal.

Cada sustancia cristalina tiene un patrón de difracción único y característico. El número de picos observados se relaciona con la simetría que posee la celda unidad que compone el cristal. En otras palabras, los ángulos determinados por los picos brindan información sobre el tipo de simetría presente en el cristal. Como regla general cuanto mayor sea la simetría menor será la cantidad de máximos observados en el difractograma. Por su parte la intensidad de estos máximos da cuenta del tipo de átomo presente. Por ejemplo, un átomo ligero dispersará los haces de rayos X de forma débil dando lugar a picos de menor intensidad, mientras que átomos más densos aumentaran la señal. En resumen, el número de picos, su posición e intensidad determinan patrones característicos para cada estructura cristalina de un cierto material⁴⁴.

Un cristal puede definirse como una estructura en mosaico formada por la repetición de un patrón básico definido, que se identifica como *celda unidad*. Los cristales adoptan distintos tipos de formas de acuerdo con el tipo de simetría que presente la celda unidad. En todos los casos las celdas unidad son paralelepípedos, cuyas restricciones en los ángulos y las distancias interatómicas determinarán los tipos de sistemas cristalinos con sus posibles simetrías. La Tabla 4 muestra los 7 tipos de sistemas cristalinos con sus restricciones, el tipo de simetría que presentan y las posibles posiciones de los átomos que forman el sólido dentro de la celda unidad, que reciben el nombre de puntos reticulares⁴⁵.

Combinando los 7 sistemas cristalinos con las ubicaciones de los puntos de la red se obtienen 14 configuraciones básicas diferentes que reciben el nombre de *redes de Bravais*,

siendo estas matemáticamente las únicas formas de rellenar un espacio de manera periódica aplicando las funciones de traslación y rotación de la celda unidad ⁴⁵.

Tabla 4: Diferentes tipos de estructuras cristalinas y sus restricciones espaciales. Adaptado de referencia ⁴⁴.

Sistema cristalino	Restricciones	Simetría	Red cristalina
Cúbica	$a = b = c$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	$m\bar{3}m$	P, I, F
Tetragonal	$a = b \neq c$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	$4/m\bar{m}m$	P, I
Ortorrómbica	$a \neq b \neq c$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	$6/m\bar{m}m$	P
Monoclínica	$a \neq b \neq c$ $\alpha = \gamma = 90^\circ; \beta \neq 90^\circ$	$3m$	R
Triclínica	$a \neq b \neq c$ $\alpha \neq \beta \neq \gamma \neq 90^\circ$	mmm	P, C, I, F
Hexagonal*	$a = b \neq c$ $\alpha = \beta = 90^\circ; \gamma = 120^\circ$	$2/m$	P, C
Trigonal*	$a = b \neq c$ $\alpha = \beta = 90^\circ; \gamma = 120^\circ$	1	P

*Las estructuras trigonales se diferencian de las hexagonales en el tipo de simetría siendo C_6 para la hexagonal y C_3 para la trigonal. P es la celda primitiva donde los puntos reticulares son los vértices del paralelepípedo que forma la celda unidad. F es la celda centrada en las caras donde los puntos reticulares en los vértices y en las caras de la celda unidad. I es la celda centrada en el cuerpo con sus puntos reticulares en los vértices y en el centro de la celda.

Como se describía anteriormente, cada pico en el difractograma surge de un único set de planos repetitivos que forman la estructura. En el polvo del material de estudio, estos conjuntos de planos se distribuyen de forma aleatoria en todas direcciones, sin embargo las señales solamente serán visibles siempre que se orienten de forma relativa al haz de rayos incidente.

El conjunto de planos que presentan el mismo tipo de simetría se describe mediante los índices de Miller (h, k, l) los cuales se emplean para especificar la orientación de los planos respecto a la celda unidad. Estos índices se calculan a partir de los recíprocos de las intersecciones de los planos con los ejes (x, y, z) (Figura 15).

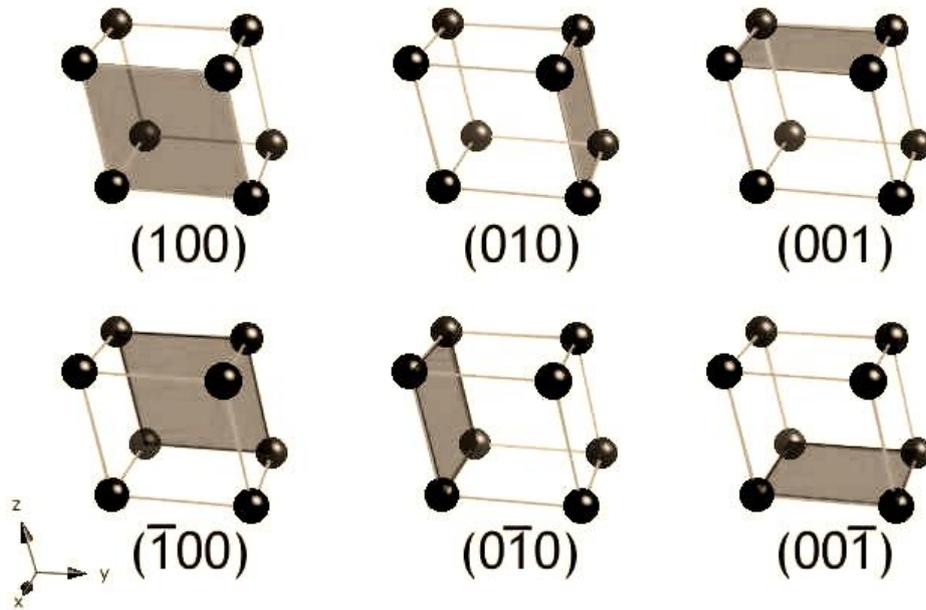


Figura 15: Ejemplos de las distintas orientaciones de los planos cristalinos, con sus respectivos índices de Miller. Para una celda unidad de ejes (a,b,c) si el plano cristalino tiene una orientación (h,k,l) significa que intercepta a la celda unidad en los puntos $(a/h,0,0)$, $(0,b/k,0)$ y $(0,0,c/l)$.

La asignación de los índices de Miller (h,k,l) a cada pico de difracción depende del tipo de simetría del sistema cristalino, por lo que es necesario cotejar las soluciones de forma iterativa. Por ejemplo, para una estructura ortorrómbica la relación queda expresada por:

$$\frac{1}{d_{hkl}^2} = \frac{h^2}{a^2} + \frac{k^2}{b^2} + \frac{l^2}{c^2} \quad (33)$$

mientras que para la una celda cúbica es:

$$\frac{1}{d_{hkl}^2} = \frac{h^2 + k^2 + l^2}{a^2} \quad (34)$$

donde a,b y c son los parámetros de la red y h,k,l son los índices de Miller. De esta forma para cada estructura se pueden calcular los índices de Miller a partir de las distancias de los planos, determinada por los ángulos en donde aparecen los picos máximos del diagrama de difracción. Para esto existen programas computacionales que realizan la ardua tarea de procesar la gran cantidad de cálculos, comparándolos con bases de datos, permitiendo de

esta forma la identificación de las sustancias y la determinación de las estructuras cristalinas de los compuestos de estudio ⁴⁴.

Método de Debye-Scherrer

La ecuación de Debye-Scherrer permite estimar el tamaño promedio de las cristalitas a partir del ancho medio de pico para un determinado ángulo de difracción. Matemáticamente se expresa como:

$$\text{Tamaño de la cristalita} = \frac{K\lambda}{\beta \cos\theta} \quad (35)$$

donde K es un factor asociado a la forma de la cristalita (generalmente entre 0.9 – 1), λ representa la longitud de onda 1.541 Å, β es el ancho de medio pico y θ su ángulo. Esta herramienta tiene la limitante de ser solamente efectiva para cristalitas de tamaño inferior a los 100 nm y solamente da cuenta del tamaño de la misma, por lo que a diferencia de la microscopía no distingue agregados, partículas individuales, formas, etc ⁴⁴.

1.7 Voltamperometría cíclica

Fundamento de la técnica

La voltamperometría cíclica es probablemente una de las técnicas electroquímicas más empleadas para el estudio de reacciones electródicas, debido a su versatilidad y a la cantidad de información que puede obtenerse de sus resultados. Se basa en la aplicación de un barrido de potenciales en ambos sentidos, anódico o catódico, observándose a lo largo del proceso los picos de intensidad que se generan como resultado de los procesos de electro-reducción y/o electro-oxidación de las especies electroactivas. Los ciclos de barrido pueden repetirse "n" cantidad de veces, lo cual justifica el nombre de voltamperometría cíclica. De esta forma pueden obtenerse información acerca de los potenciales redox de las especies, cantidad de carga, concentración, reversibilidad de las reacciones, información de las interacciones de especies absorbidas sobre los electrodos de trabajo, coeficiente de difusión de los analitos, etc⁴⁶.

Los voltamperogramas se obtienen midiendo la corriente que pasa por el electrodo de trabajo sumergido en un electrolito sin agitación. Los parámetros de interés de las voltamperometrías cíclicas incluyen las corrientes de pico a los potenciales de reducción y/o oxidación, y la separación de estos potenciales. Para un sistema reversible es esperable que los picos correspondientes al proceso de reducción se encuentren aproximadamente en la misma posición¹, pero en sentidos opuestos, mientras que para procesos irreversibles los potenciales pueden estar varios órdenes de magnitud corridos, pudiendo no observarse incluso el potencial en sentido inverso. Como regla general se considera que un proceso es reversible si se cumple que:

$$E_{pa} - E_{pc} \approx \frac{59}{n} mV \quad (36)$$

donde n representa el número de electrones transferidos en cada proceso y E_{pa} , E_{pc} representa el potencial de pico anódico y catódico respectivamente (Figura 16)⁴⁷.

¹ Idealmente deberían aparecer al mismo potencial, sin embargo debido a un efecto difusional de los iones en la interfase del electrodo, existen ligeros corrimientos de las señales que dependerán de varios factores, como la agitación, el potencial, la velocidad de barrido, la geometría del electrodo, etc.

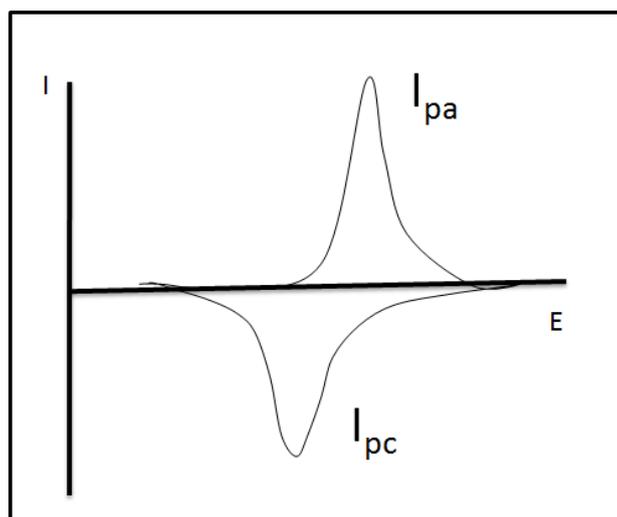


Figura 16: Voltamperograma típico mostrando las corrientes de pico anódico (I_{pa}) y catódico (I_{pc}) respectivamente.

Es una práctica común de los electroquímicos presentar el potencial redox de las especies reversibles como el promedio de los potenciales de pico del proceso anódico y catódico. Esta aproximación es válida solamente si la constante de transferencia electrónica corresponde a un proceso reversible y si la constante de difusión es igual para ambos procesos⁴⁷.

Por reversible se entiende que la reacción es lo suficientemente rápida para mantener las concentraciones de las especies oxidadas y reducidas en equilibrio en la interfase del electrodo. Esta relación está dada por el potencial de Nerst:

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \log \frac{\prod [O]^{\beta_i}}{\prod [R]^{\gamma_i}} \quad (37)$$

donde n es el número de electrones intercambiados, R la constante de los gases, T la temperatura E^0 es el potencial estándar, F la constante de Faraday y $[O]$ y $[R]$ el cociente de los productos de las concentraciones de las especies oxidadas y reducidas elevadas a sus correspondientes coeficientes estequiométricos, respectivos⁴⁸.

En este sentido, que un proceso sea reversible o irreversible, depende no solo de la naturaleza química del analito, sino también de las velocidades de barrido empleadas.

La ecuación matemática que cuantifica intensidad máxima es la ecuación de Randles-Sevcik:

$$I_p = -(2.69 \times 10^5) n^{\frac{3}{2}} C_0 D^{\frac{1}{2}} v^{\frac{1}{2}} \quad (38)$$

donde I_p es la densidad de corriente pico D es el coeficiente de difusión, v es la velocidad de barrido y C_0 es la concentración de la especie oxidada. Como podemos ver la densidad de corriente de pico es proporcional a: la concentración de la especie electroactiva, la raíz cuadrada de la velocidad de barrido y al coeficiente de difusión ⁴⁸.

Para el caso de sistemas irreversibles y cuasirreversibles, la separación de los potenciales es mayor a $\frac{59}{n}$ mV y depende de la velocidad de barrido. Por su parte la relación de las corrientes de pico también se afectan, de forma que cuanto más irreversible sea el proceso, más pequeño será la intensidad del pico en el barrido inverso. Esto se debe a que en ciertos sistemas irreversibles generalmente ocurre que las especies oxidadas difunden a al seno de la solución, por lo que al aplicar el potencial inverso, no se encuentran a tiempo en la interfase para alcanzar el pico en el barrido inverso⁴⁷.

$$I_p = (2.99 \times 10^5) n (\alpha n_\alpha)^{\frac{1}{2}} A D_0^{\frac{1}{2}} v^{\frac{1}{2}} C_0 \quad (39)$$

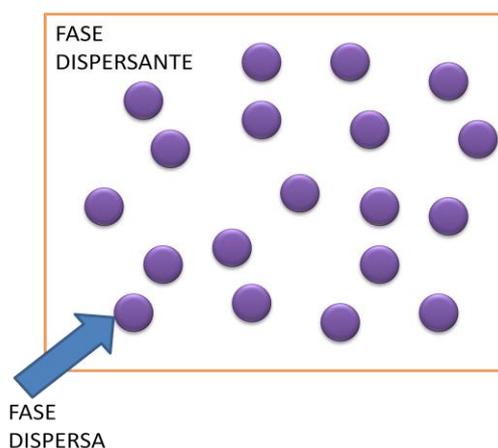
donde n_α es el número de electrones transferidos en el paso determinante de la reacción, α el coeficiente de transferencia (que generalmente vale 0.5) ⁴⁸.

Capítulo II: Estabilidad de los sistemas coloidales

La distinción entre una disolución química, una dispersión y una solución coloidal depende del tamaño de las partículas. La primera es una mezcla a nivel molecular o iónico de dos sustancias o más que no reaccionan entre sí para dar lugar a un sistema homogéneo con una única fase. Una dispersión de partículas en emulsión forman un sistema heterogéneo donde la velocidad de sedimentación (v) es proporcional al cuadrado del diámetro de la partícula ⁴⁹⁻⁵⁰.

$$v = \frac{D^2 g (\rho - \rho_0)}{18} \quad (1)$$

Un coloide es un sistema heterogéneo formado por una fase continua denominada *fase dispersante* y una *fase dispersa* constituidas por entidades o partículas con tamaños en el rango de 1 nm - 1 μ m. A diferencia de las soluciones, los coloides presentan el fenómeno Tyndall, se puede separar por filtración y pueden precipitar.



La característica más sobresaliente de los sistemas coloidales es que por el tamaño pequeño de las partículas, éstas no precipitan con la gravedad, sino que se mantienen en suspensión en continuo movimiento browniano.

De acuerdo al tipo de fase dispersa y dispersante, los coloides reciben distintos nombres:

- Emulsiones: dispersión coloidal de un líquido en otro inmiscible con él.
- Soles Coloides inestables o metaestables. Partícula dispersante sólida y fase dispersa líquida.

- Geles: Coloides dónde la fase dispersa es líquida y la fase continua es sólida.
- Espumas: Coloides en donde la partícula dispersante es un gas y la fase dispersa es líquida.

2.1 Efecto Tyndall

El efecto Tyndall describe los fenómenos de dispersión de luz de suspensiones coloidales, permitiendo determinar si una muestra problema es una suspensión coloidal o una solución (Figura 1).

Fue descrito por primera vez en el año 1868 a partir de observaciones en aerosoles. Tyndall encontró que al irradiar con luz un aerosol en sus primeras etapas de formación se generaba una nube de color azul capaz de polarizar el haz en un ángulo de 90° . Más tarde determinaría que el fenómeno observado se debía a la luz dispersada por las pequeñas partículas presentes en el aerosol, y que dicho fenómeno se extiende para cualquier sistema coloidal independientemente de la naturaleza del mismo, llegando a conectar este hecho con el color azul observado en el cielo. La razón de que se observe un color azul, es que las longitudes de onda de mayor energía tienden a dispersarse, mientras que las de menor energía tienden a transmitirse ⁵¹.

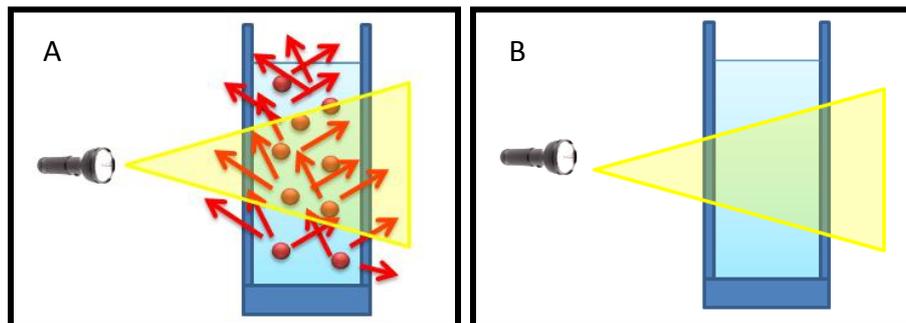


Figura 1: Aplicación del efecto Tyndall para determinar si la muestra es una dispersión coloidal (A) o una disolución homogénea (B). En el primer caso se observa la luz dispersada por las partículas, mientras que en el segundo toda la luz es absorbida o transmitida.

2.2 Teoría Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO)

La teoría DLVO ⁵² describe los fenómenos de atracción y repulsión entre coloides que presentan cargas superficiales, a partir de la combinación de los efectos de las fuerzas de atracción de Van der Waals y las repulsiones electroestáticas.

Si bien al día de hoy la teoría sigue en vigencia, existen otros trabajos en los que se plantean desviaciones de la misma a la hora de explicar la estabilidad de los sistemas coloidales ⁵³⁻⁵⁵. De esta manera surgen diferentes extensiones que incorporan factores que no son tenidos en cuenta en la teoría clásica de DLVO. Sin embargo, para los casos simples de estabilizaciones electroestáticas, los modelos siguen resultando útiles a la hora de entender los procesos de agregación de las partículas. En el apartado siguiente se muestra el caso de un ejemplo de estabilización que se trata en forma independiente de la teoría de DLVO; la estabilización estérica.

La teoría de DLVO se basa en las siguientes asunciones básicas ⁵⁶:

- La superficie molecular de las partículas es sólida, plana, sin defectos e inertes (con la salvedad de la presencia de cargas superficiales).
- Las moléculas de solvente tienen las mismas propiedades del líquido macroscópico en el seno de la solución y solo se afectan en la interface con la partícula.
- Las fuerzas, producto de la doble capa eléctrica y las fuerzas de Van der Waals son consideradas independientes y aditivas.
- La carga eléctrica en la frontera de la doble capa electroquímica es considerada constante.
- Las fuerzas de repulsión, por efecto de la doble capa, son calculadas a partir de la ecuación no lineal de Poisson-Boltzmann.
- Las fuerzas atractivas de Van der Waals entre los planos de las partículas se calculan suponiendo que el líquido, en donde el coloide se encuentra disperso, presenta una densidad homogénea.
- El efecto de la tensión superficial es ignorado.

Tal y como aparece en los supuestos anteriormente mencionados, la teoría básica de estabilización coloidal se sustenta en la competencia entre las fuerzas atractivas de Van der Waals y las repulsiones electroestáticas, producto de las cargas superficiales de los coloides ⁵⁷ cuyo equilibrio mantiene a las partículas en suspensión sin agregarse. Las fuerzas de Van der Waals incluyen las interacciones débiles que se generan entre las moléculas, de entre las cuales se distinguen la interacción dipolo-dipolo, las fuerzas por dipolo inducido y las fuerzas de dispersión de London, son las responsables de la agregación de las partículas en suspensión en ausencia de un agente protector. Según la teoría DLVO, la estabilidad se logra cuando estas fuerzas son contrarrestadas por fuerzas opuestas electroestáticas que surgen de la presencia de una doble capa electroquímica en la vecindad de la interfase entre la partícula y la fase dispersante que la contiene. De esta forma, asociado a cada una de las fuerzas, se pueden identificar energías potenciales de atracción y energías de repulsión las cuales definen una resultante que determina la estabilidad del coloide. La Figura 2 muestra un esquema de energía potencial total (V_{Total}) vs. la distancia entre las partículas (r). Existen al menos dos mínimos de energía posibles en función de la distancia de las partículas. El primero describe un proceso de floculación débil, que puede ser fácilmente revertido. En estos casos también se habla de nanopartículas coaguladas, siempre que mantengan la identidad de cada partícula en el agregado y por tanto el proceso puede ser reversible cambiando las condiciones del medio ⁵⁸. Este proceso incluye los fenómenos de agregación de nanopartículas que pueden volver a redispersarse, tal y como ocurre durante centrifugaciones a velocidades moderadas o en liofilizaciones. El segundo proceso ocurre en un mínimo de energía potencial, a distancias mucho más cercanas entre las partículas. Cuando la barrera de energía potencial que mantiene estable al coloide se supera la agregación se torna irreversible y las fuerzas de repulsión electroestáticas se vencen completamente, en este caso se dice que los agregados coalescen, pues se pierde la identidad de la partícula ⁵⁸.

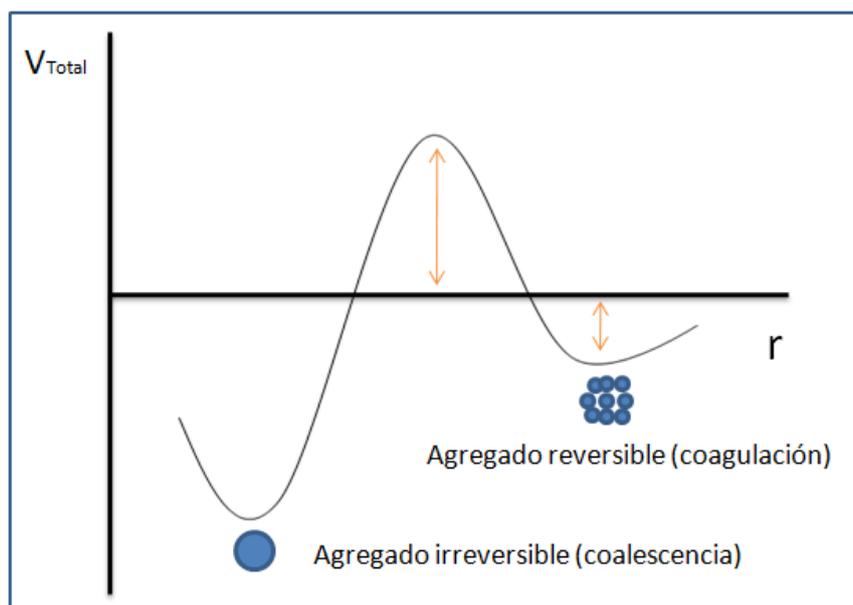


Figura 2: El gráfico esquematiza las dos clases de agregados en función del balance energético generado por las fuerzas de repulsión (electroestática) y las fuerzas atracción (Van der Waals) de acuerdo a la ecuación: $V_{Total} = V_{vdW}(r) + V_c(r)$.

Existen diversos agentes, tanto físicos como químicos, capaces de desestabilizar a los coloides. En ambos casos el objetivo de lograr la agregación de las partículas consiste en vencer las fuerzas de repulsión, lo cual puede lograrse ya sea de forma mecánica como el caso de centrifugaciones y/o liofilizaciones, aumentando las distancias entre las partículas o por métodos fisicoquímicos, que involucran todos aquellos capaces de modificar el tamaño de la doble capa electroquímica. Son ejemplos de estos últimos el agregado de una sal, cambios en el pH o mediante el agregado de cualquier molécula capaz de modificar la superficie de la nanopartícula.

La coagulación de coloides aparece principalmente en aerosoles, pero rara vez en hidrosoles. La razón se fundamenta en las diferencias de cargas que presentan las partículas en ambos sistemas. Los aerosoles, en general, al poseer carga neta neutra, las fuerzas que predominan son de tipo atractivas fundamentalmente por fuerzas débiles de tipo Van der Waals; mientras que los hidrosoles predominan las fuerzas electroestáticas de repulsión que mantienen las partículas separadas⁵⁸. Las nanopartículas metálicas por su parte se encuentran a medio camino, dado que dependiendo del agente de recubrimiento, será el tipo de estabilización que posea.

El balance de fuerzas que describe la teoría DLVO puede resumirse matemáticamente en dos ecuaciones simplificadas ^{56,58}, que describen las energías de atracción y repulsión para dos partículas esféricas de diámetro $2R$ ubicadas a una distancia relativa r :

$$V_c(r) = 4\pi\epsilon\epsilon_0 R \Psi_0^2 \frac{R-r}{r} \log \left\{ 1 + \frac{R}{r-R} e^{[-\kappa(r-2R)]} \right\} \quad (2)$$

$$V_{VdW}(r) = -\frac{H}{6} \left[\frac{2R^2}{r^2-4R^2} + \frac{2R^2}{r^2} + \log \left(\frac{r^2-4R^2}{r^2} \right) \right] \quad (3)$$

donde $V_c(r)$ representa el potencial Coulombimétrico (por repulsión de cargas) que resulta de la doble capa electroquímica y actúa de forma opuesta a la atracción por fuerzas de Van der Waals, Ψ_0 es el potencial externo de la superficie de las partículas, y κ es una variable que describe el radio de la nube $\left(\frac{1}{\kappa}\right)$ electrónica de la doble capa electroquímica determinada en expresión de Debye-Hückel:

$$\kappa = \frac{e^2}{\epsilon\epsilon_0 k_B T} \sum_j n_j z_j^2 \quad (4)$$

con ϵ y ϵ_0 la permitividad del medio y del vacío respectivamente, k_B la constante de Boltzmann, T la temperatura absoluta y n_j y z_j la concentración y la carga de los iones de tipo j . Por su parte, $V_{VdW}(r)$ representa la energía de atracción por fuerzas de Van der Waals donde H es la constante de Hamaker.

El balance entre ambos potenciales generados por las fuerzas de atracción y repulsión, definen la estabilidad del coloide en función de la distancia entre las partículas (Figura 2).

2.3 La doble capa electroquímica

El concepto de doble capa electroquímica es un modelo que explica la presencia de superficies cargadas en la interface electroquímica entre un electrodo y el seno de la solución. La teoría sufrió ligeras modificaciones a lo largo de la historia desde el primer modelo planteado por Helmholtz ⁵⁶ hasta el actual modelo de Gouy-Champman-Stern. En el último se plantea que la interface está formada por dos capas: una interna que contiene las moléculas de solvente y las moléculas de las especies adsorbidas al electrodo, que se encuentra cargado con un signo opuesto a los iones que forman la capa. Esta capa interna, o compacta se conoce como la primera capa de Stern. La segunda capa la forman los iones

solvatados que se aproximan a la primera por atracción eléctrica de la partícula, pero al acercarse a la misma, presentan la repulsión de las cargas que forman la primera capa de Stern, formándose de esta manera la segunda capa electroquímica, conocida como capa difusa, y completando de esta manera la doble capa electroquímica (Figura 3).

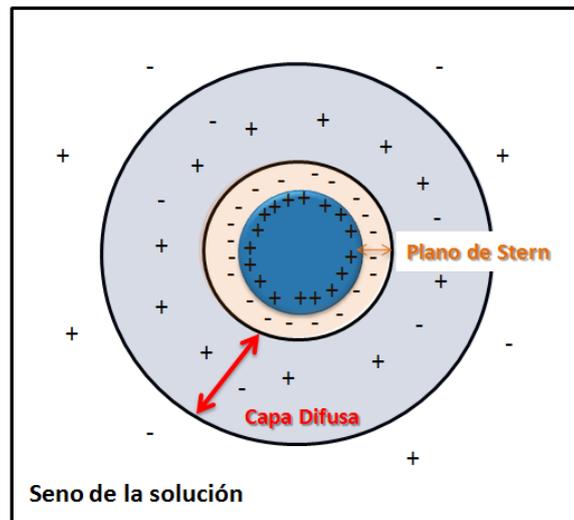


Figura 3: Esquema representando la doble capa electroquímica de una partícula esférica cargada positivamente.

A la diferencia de potencial entre el seno de la solución y la partícula, a la altura de la capa difusa, se denomina el potencial Z de la partícula, definiendo así la carga eléctrica neta de la partícula en solución.

2.4 Potencial Z

El potencial Z es una magnitud física que define la carga neta que presentan las partículas coloidales. Las mediciones de potencial Z se realizan de forma indirecta a través de medidas de dispersión de luz en presencia de un campo eléctrico. La ecuación que vincula la movilidad de las partículas con su potencial Z se describe a continuación:

$$U_E = \frac{2\varepsilon z f(Ka)}{3\eta} \quad (5)$$

Donde z representa el Potencial Z, U_E La movilidad de la partícula, ε la constante dieléctrica del medio, η la viscosidad y $f(Ka)$ representa la función de Henry (que generalmente vale 1 o 1.5). La constante dieléctrica así como la viscosidad son dependientes de la naturaleza del solvente utilizado. La movilidad se calcula a partir de las medidas de dispersión de luz; y la

función de Henry se determina teóricamente, de acuerdo al tamaño de la partícula y a la concentración salina del solvente. En este sentido surgen 2 métodos para la determinación del potencial Z: el método de Hückel y el de Smoluchowski.

Método de Hückel

Se utiliza para partículas de tamaño pequeño y/o solventes no acuosos o para soluciones de baja concentración salina. Permite calcular el potencial Z a partir de aproximar la función de Henry a 1 (Ec. 5).

Método de Smoluchowski

Es usado, para partículas mayores a ca. 200 nm y/o para concentraciones salinas de 10 mM, que determina una doble capa electroquímica fina. Permite calcular el potencial Z a partir de aproximar la función de Henry a 1.5 (Ec. 5).

2.5 Factores que afectan la estabilidad del coloide

En medio acuosos, el pH de la muestra es uno de los factores más relevantes capaces de afectar el potencial Z de las partículas. La carga eléctrica de las partículas dependerá del estado de protonación de los grupos funcionales presentes en el agente de recubrimiento, así como también de las cargas superficiales adsorbidas. En este sentido, presentar un valor de potencial Z sin establecer las condiciones de medida, carece de completo sentido. Por definición, el valor de pH al cual el potencial Z vale 0 se denomina punto isoeléctrico; y dentro del contexto de la teoría de DLVO este punto es el de menor estabilidad del coloide. Desde el punto de vista práctico, coloides con potenciales entre ca. +30 y -30 mV se consideran estables, por fuera de estos valores se produce la agregación. Es importante resaltar que estas consideraciones son válidas para ligandos que estabilizan electrostáticamente, quedando por fuera de la consideración estabilización estérica. Visto de otra forma, es posible obtener soluciones coloidales estables a potenciales Z de 0 siempre que la estabilización sea de tipo estérica.

Además del pH es necesario establecer los valores de conductividad de la solución, dado que la fuerza iónica afecta el tamaño de la doble capa electroquímica (Figura 4) y por tanto modifica el cálculo del potencial Z.

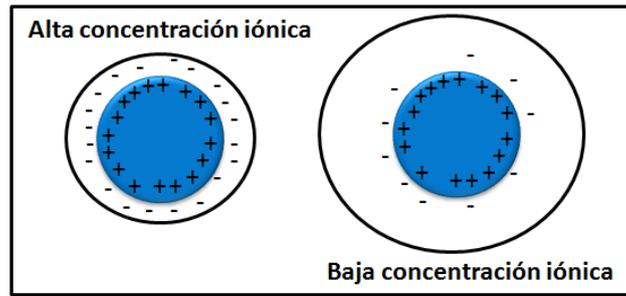


Figura 4: Se esquematiza el efecto de la concentración iónica sobre la doble capa electroquímica.

La magnitud en que los aniones afectan la doble capa electroquímica depende del tipo de anión y sigue la serie de Hofmeister ⁵⁸. En todos los casos la compresión de la doble capa electroquímica afecta la estabilidad del coloide, pudiendo disminuir las energías de separación de las partículas dando lugar a la formación de agregados.

Además de los factores electroestáticos mencionados, la estabilidad del coloide puede modificarse por otras vías como son la adsorción de un precipitado, cuando la formación de un agregado arrastra a las partículas que se encuentran en suspensión o la formación de puentes moleculares entre las partículas, cuando las partículas se encuentran recubiertas con agentes con estructuras complementarias. Dentro de este último grupo se ubican la gran mayoría de los sensores químicos basados en el uso de nanopartículas. ⁵⁹.

Seguimiento del proceso de agregación

Cuando las nanopartículas se agregan, el clúster formado puede dar lugar propiedades nuevas emergentes que no se encuentran en las partes que lo componen. A modo de ejemplo, los colores llamativos de la gema de ópalo (Figura 5) resultan de múltiples dispersiones de luz de las esferas de óxido de silicio de 250 nm, las cuales se encuentran estrechamente empaquetadas una de otra, formando una red cristalina cúbica. Las fuerzas de Van der Waals entre las partículas mantienen la estructura agregada que genera los distintos colores observados ⁵⁸.

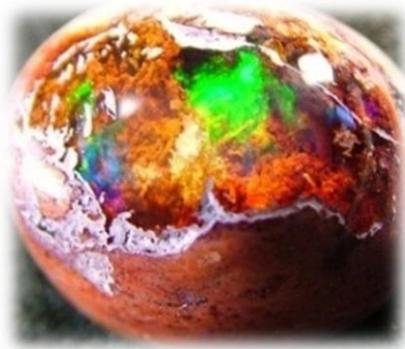
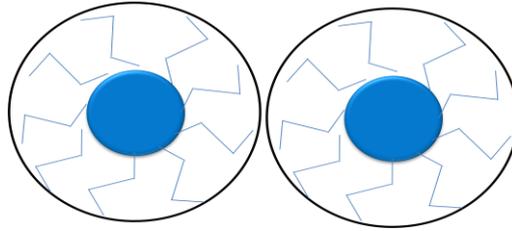


Figura 5: Piedra de ópalo

Como se describía anteriormente, la agregación entre las partículas puede dar lugar a dos tipos de agregados, dependiendo de la energía involucrada en el proceso. De esta forma frente a fuerzas débiles, como atracciones de tipo Van der Waals, en general se logran distancias inter-partículas moderadas, formando aglomerados coagulados, que mantienen la identidad de cada partícula. En contrapartida, cuando la fuerza de atracción se encuentra gobernada por enlaces químicos fuertes, se crea una nueva unidad irreversible que pierde la individualidad de cada partícula, siendo en este caso agregados que coalescen. Estos procesos vienen acompañados de una reducción del área superficial de las partículas y por tanto son en general procesos exotérmicos. La coalescencia frecuentemente viene acompañada del surgimiento de nuevas propiedades emergentes en particular de tipo ópticas y eléctricas, como es el caso de la piedra de ópalo. Algunos tipos de agregados coalescentes son también agregados fractales, dado que en esencia están formados por el aglomerado de un largo número de partículas primarias iguales o muy similares entre sí ⁵⁸.

2.6 Estabilización estérica

La estabilización por repulsión estérica se genera con toda aquella molécula (en general de gran tamaño) capaz de unirse a las nanopartículas e impedir que estas entren en contacto cercano. Mientras que la estabilización electrostática es de tipo termodinámica, dado que depende de las energías de repulsión y atracción, la estabilización estérica sigue un mecanismo fundamentalmente cinético. La presencia de macromoléculas retarda el movimiento aleatorio de las partículas, bajando la probabilidad de choques efectivos que logren superar la barrera de energía potencial necesaria para que se genere la agregación del coloide ⁵⁸.



Estabilización estérica

Cada mecanismo tiene sus propios beneficios: La estabilización estérica es simple y en general la protección es más resistente a los cambios de pH temperatura y fuerza iónica, a diferencia de la estabilización electrostática. En contrapartida, en situaciones donde la floculación es deseada la estabilización estérica dificulta el proceso.

El fenómeno de agregación de las partículas, depende fundamentalmente de dos factores: el agente protector y el medio en el cual se encuentran las partículas. El poder estabilizante del agente protector dependerá de la naturaleza del mismo. A modo práctico se los pueden clasificar entre protectores de tipo: estérico, electrostático y electroestéricos.

La protección estérica se basa en el impedimento físico que mantiene las partículas separadas. En general la protección por esta vía es mucho más fuerte que la estabilización electrostática, la cual cambia en función de las condiciones del medio pH, fuerza iónica.

Maduración de Ostwald

La maduración de Ostwald es un fenómeno termodinámico observado en los sistemas coloidales por el cual las partículas de menor tamaño coalescen con las partículas de mayor tamaño. El desbalance termodinámico existe debido a que en los sistemas coloidales hay una mayor área superficial, cuya energía asociada puede minimizarse si se disminuye el tamaño de la superficie total de la fase dispersa. Debido a que la contribución de las energías superficiales es baja, los procesos se observan en largos intervalos de tiempo⁶⁰.

Capítulo III: Determinación de la pureza del borohidruro de sodio

3.1 Introducción

El borohidruro de sodio es un compuesto químico extensamente utilizado como agente reductor en la síntesis de compuestos orgánicos, nanopartículas y como medio de almacenamiento de hidrógeno, especialmente para su aplicación en celdas de combustible⁶¹⁻⁶². Sin embargo, su extrema higroscopicidad e inestabilidad en ambientes húmedos lo hacen un reactivo de difícil manipulación. Por este motivo, es necesario contar con un método analítico para la evaluación de su estado previo a su uso.

De acuerdo con la bibliografía consultada, la gran mayoría de los métodos de síntesis de nanopartículas metálicas como el oro o la plata utilizan este agente como fuente de potencial reductor. Sin embargo, existen antecedentes que demuestran que la síntesis de nanopartículas es muy sensible a la relación entre la cantidad de plata agregada y la concentración del agente reductor⁶³, lo que motivó desde el comienzo, la necesidad de evaluar el estado del reactivo previamente a ser utilizado como agente reductor, ante la posibilidad de que los productos de descomposición pudieran afectar la reproducibilidad de los experimentos de síntesis.

Sorprendentemente, la técnica analítica de referencia, provista por el fabricante (Sigma-Aldrich), data del año 1952, y se reduce al método de titulación por iodometría⁶⁴. Esta técnica, aunque robusta, presenta ciertas dificultades experimentales que no la hacen práctica a la hora de evaluar de manera rápida el reactivo para su uso inmediato. En este sentido se diseñó un método sencillo y moderno por espectroscopía infrarroja que permite el análisis de rutina del reactivo previo a su uso. La técnica desarrollada se comparó con la iodometría clásica y con un método electroquímico, el cual fue ligeramente modificado para obtener mejores resultados.

3.2 Materiales y métodos

Para el estudio se contó con un reactivo recién adquirido, sin abrir, de borohidruro de sodio anhidro (NaBH_4), número de registro 16940-66-2 Aldrich, lote STBB1392. De acuerdo con la información reportada por el fabricante la pureza es superior al 98.85%, conteniendo 0.52% de MgCO_3 añadido como agente desecante. Para evaluar la presencia de impurezas generadas por la humedad a lo largo del tiempo de almacenamiento, se utilizó otro frasco de borohidruro, de igual pureza y fabricante, pero ya vencido, de acuerdo con su fecha de expiración. El resto de los reactivos fueron utilizados sin purificación adicional: metaborato de sodio ($\text{NaBO}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, >99%, Aldrich); bromuro de potasio (KBr, pureza analítica para espectroscopía, Pike Technologies); hidróxido de sodio (NaOH, 97%, Anedra); tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 99.5%, Biopack); yoduro de potasio (KI, >99.5%, R. Benzo); iodato de potasio (KIO_3 , 98%, Sigma-Aldrich).

Todos los reactivos sensibles a la humedad fueron conservados en un desecador con ácido sulfúrico concentrado como agente desecante (RH 20 %). Con excepción del borohidruro de sodio anhidro, las muestras fueron secadas en un horno convencional a 80°C durante 24 hs.

Todas las disoluciones preparadas, así como también el lavado del material, se realizó con agua ultrapura (resistividad > $18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$).

Medidas electroquímicas

Los experimentos de voltamperometría cíclica se realizaron siguiendo el la técnica reportada,⁶⁵ con ligeras modificaciones que se describen a continuación: Como electrodo de trabajo se utilizó un disco de oro de 3 mm de diámetro y un área geométrica de 0.071 cm^2 (CHI Instruments). Como contra-electrodo se utilizó una mina de grafito y como electrodo de referencia se utilizó un electrodo de calomel (SCE, $E=0.244 \text{ V-SHE}$ a 20°C , NaCl 3M). El electrodo de oro fue previamente pulido con polvo de alúmina de $0.05 \mu\text{m}$, seguido de ultrasonido y lavado en abundante agua pura. Como electrolito soporte se utilizó una disolución 2 M de NaOH y las soluciones de borohidruro se prepararon directamente en el electrolito soporte inmediatamente antes del análisis en el rango de concentraciones entre 0.5 y 10 mM. Todas las disoluciones fueron purgadas de oxígeno por burbujeo de nitrógeno

ultrapuro y todas las medidas fueron realizadas manteniendo en la celda electroquímica una atmósfera de nitrógeno.

Las medidas electroquímicas se realizaron utilizando un potenciostato Voltalab PGZ 301 (Radiometer, Suiza). Los voltamperogramas cíclicos se obtuvieron entre -0.90 y 0 V a una velocidad de 0.100 V s^{-1}

Medidas por iodometría

Las titulaciones por iodometría se realizaron siguiendo la técnica reportada⁶⁴. Brevemente, se disolvieron con agitación moderada cantidades entre 25 y 35 mg de borohidruro de sodio sobre 25 mL de una disolución de NaOH 0.5 M, previamente patronizada con una disolución de KIO_3 0.04 M.

Medidas por espectroscopía infrarroja

Las medidas por espectroscopía infrarroja se realizaron en el rango de longitudes de onda entre 400 y 4000 cm^{-1} , a temperatura ambiente, en un equipo *Shimadzu* modelo *IR-Prestige 21*, promediando 10 barridos a una resolución de 4 cm^{-1} , y utilizando una apodización Happ-Genzel.

Las medidas del NaBH_4 humedecido se realizaron dejando las muestras en atmósfera controlada durante 4 horas a 70% de humedad relativa (HR) y 3 días a 98% (HR). En el último caso se observó la formación de agua líquida adsorbida del ambiente sobre la muestra. Las humedades relativas de las atmósferas controladas fueron medidas con un termómetro de bulbo húmedo.

La curva de calibración se construyó a partir de los espectros medidos sobre preparados de 500 mg de de KBr, pesando diferentes relaciones de masa entre el metaborato y el borohidruro. En todos los casos se tuvo especial cuidado en lograr mezclas de polvos homogéneas y se minimizó al máximo posible el tiempo de exposición de la muestra a la humedad ambiente.

Todos los espectros colectados fueron procesados con ajuste de la línea de base y corrección atmosférica y de CO_2 , utilizando la configuración recomendada por el software del fabricante del equipo.

Medidas de rayos X

Las medidas en XRD se realizaron mediante un barrido de ángulo rasante, 2θ comprendido entre 10° y 65° , a temperatura y humedad ambiente usando una radiación $\text{CuK}\alpha$ (1.5418 \AA) con un voltaje de tubo de 30 kV y una corriente de 40 mA. Los diagramas colectados fueron normalizados en referencia al pico máximo y comparados con la base de datos para la asignación de bandas.

Cálculos teóricos

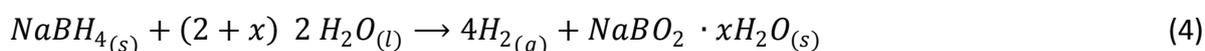
Los modelados teóricos de los espectros infrarrojos del borohidruro se obtuvieron a partir de los cálculos de optimización geométrica, en vacío, utilizando la teoría del funcional de densidad (**Density Functional Theory/B3LYP**) con una base 6-311++G (2df,2p) y utilizando la perturbación Moller-Plesset de segundo orden (MP2) con una base 6-311++G**. En ambos casos se eligió como punto de partida para el inicio de los cálculos, una molécula obtenida de los experimentos de sincrotrón de la base de datos del *Fachinformationszentrum de Karlsruhe* (Alemania) (#CSD-419045). Todos los cálculos se realizaron utilizando el *software Spartan08* y los espectros calculados sin re-escalar fueron comparados con los datos experimentales.

3.3 Resultados y discusión

De acuerdo con la bibliografía consultada,^{12,66-68} en atmósferas con humedad superior al 20% y a temperatura ambiente, el NaBH_4 originalmente en su forma anhidra, absorbe y reacciona con el agua generando metaborato de sodio (NaBO_2) como producto final de reacción, de acuerdo a las siguientes ecuaciones:



siendo la ecuación global la suma de las ecuaciones (1 – 3):



donde x representa el número de moléculas de agua, cuyo valor depende de la temperatura y la cantidad de agua presente en el sistema.

De acuerdo con las ecuaciones (1-4) la descomposición del borohidruro es un proceso irreversible, cuyo mecanismo de reacción involucra al menos tres etapas (Figura 1).

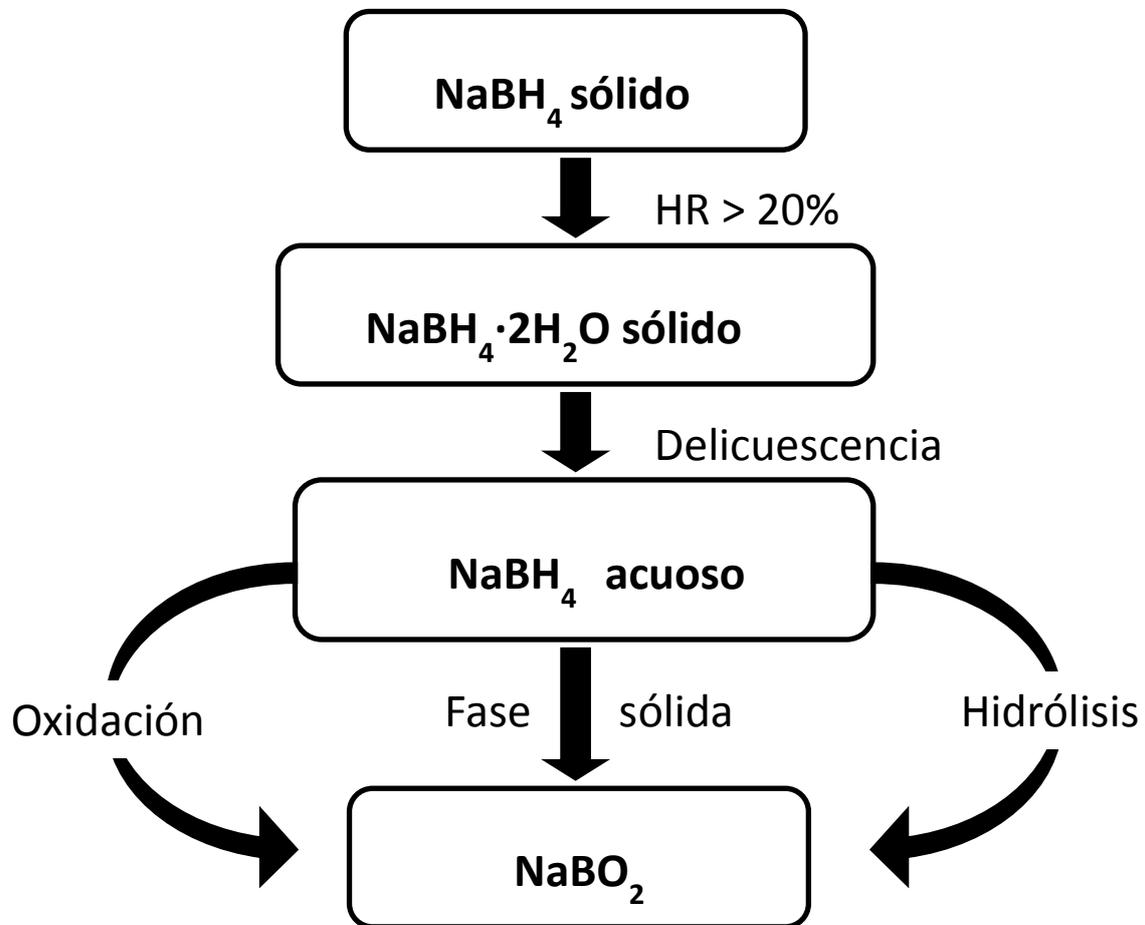


Figura 1: Esquema con las etapas del proceso de descomposición del borohidruro de sodio. Adaptado de referencia ⁶⁹.

La primera etapa, comienza cuando, a temperatura ambiente, se alcanza un valor de al menos 20% de humedad relativa; en donde bajo estas condiciones cada molécula de NaBH_4 incorpora 2 moléculas de agua de hidratación⁷⁰ (Ec.1), seguida del proceso de delicuescencia (Ec. 2) donde el borohidruro di-hidratado se disuelve en el agua adsorbida^{66,71}. Estudios teóricos, realizados con cálculos de dinámica molecular *ab initio*, mostraron que esta etapa es extremadamente rápida, pudiendo el agua adsorbida penetrar en el plano cristalino (001) en un tiempo del orden de los picosegundos⁶⁶. Finalmente el proceso se completa con la

posterior descomposición del NaBH_4 , ya sea por un proceso de oxidación (para el caso de la presencia de agentes oxidantes o a través de la aplicación de un potencial electroquímico) o por hidrólisis, generando en ambos casos la liberación de hidrógeno gaseoso y la formación de metaborato de sodio. Dependiendo del grado de humedad del ambiente puede observarse o bien el proceso global completo (Ec. 4) o bien alguna de las etapas intermedias (Ec. 1 - 3).

Si bien el proceso de hidrólisis es termodinámicamente favorable, la temperatura y el pH pueden interferir dramáticamente sobre la cinética de la reacción. En especial para el último caso, el medio ácido cataliza el proceso pasando de constantes cinéticas de hidrólisis del orden $10^{-9} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (a pH neutro) a constantes del orden de $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ en pH ácido. Por el contrario, en disoluciones básicas (pH > 13) las reacciones se enlentecen significativamente⁶⁸.

Retomando el objetivo planteado de evaluar el estado de pureza del borohidruro de sodio, parece lógico suponer que la detección del metaborato de sodio constituye una medida del deterioro del reactivo. En este sentido la espectroscopía infrarroja resulta de utilidad dado que en principio como mínimo podría utilizarse la zona de "huella dactilar" que es característica de cada sustancia y por tanto ante cualquier cambio de la composición del sistema (siempre que el compuesto sea activo en FTIR), el perfil de bandas del espectro cambiaría. Tomando esta idea como hipótesis de trabajo, se recolectaron los espectros infrarrojos de muestras de borohidruro de sodio incubadas en diferentes atmósferas con humedad controlada, durante tiempos variables. Al superponer los espectros, sorprendentemente, se encontró que en comparación con el NaBH_4 anhidro, las muestras humedecidas mostraron varias bandas que solamente aparecen en presencia de humedad. Más aún si se superpone el espectro del metaborato de sodio, se observa una superposición casi perfecta de las bandas, lo cual sugiere que efectivamente las señales observadas corresponden al compuesto mencionado (Figura 2).

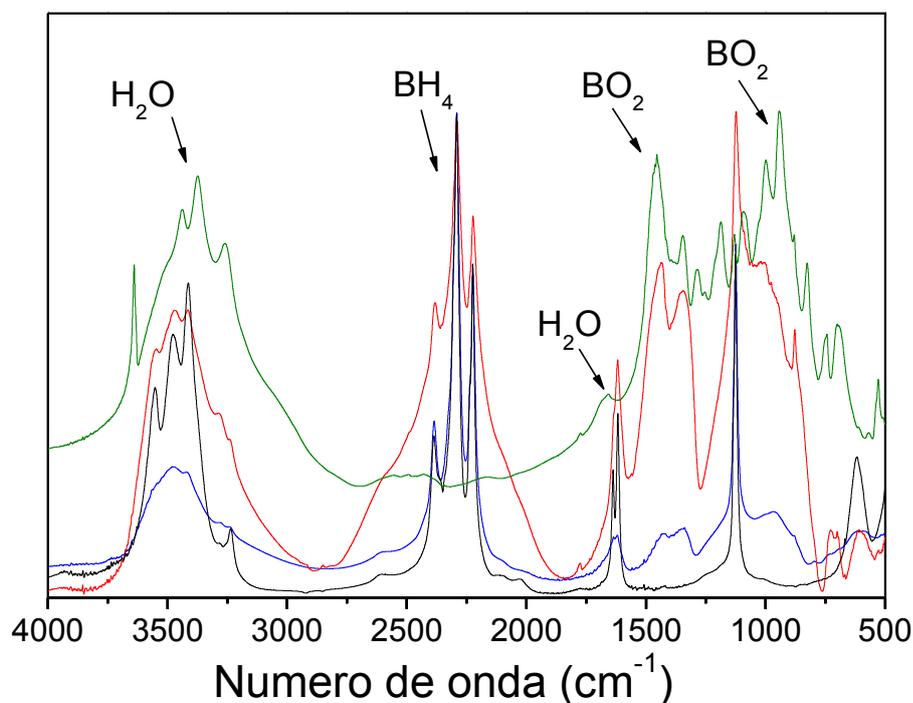


Figura 2: Espectro infrarrojo del reactivo nuevo Aldrich NaBH₄ anhidro (negro) NaBH₄, luego de ser sometido a una atmósfera de ca. 70 % HR durante 4 horas (azul), NaBH₄, ca. 98% HR durante 3 días (rojo) y reactivo Aldrich NaBO₂• 4H₂O (verde).

Para tener una mejor descripción del sistema y poder asignar las bandas observadas en los espectros con las vibraciones moleculares, se recurrió a cálculos teóricos que pudieran simular el espectro observado.

Cálculos teóricos de la estructura del borohidruro de sodio

En general, el costo computacional (tiempo de CPU y memoria dinámica) para sistemas complejos depende naturalmente del equipamiento disponible, pero también de la elección de la celda unidad a ser modelada. En este sentido, el aumento de unos pocos átomos al sistema, genera un aumento exponencial en el tiempo de ejecución de los programas. Para minimizar este problema, se optó de forma arbitraria, modelar solo una molécula de borohidruro con tan solo dos moléculas de agua de hidratación, cuyas posiciones relativas de inicio se obtuvieron de los resultados de la estructura cristalográfica obtenida de muestras experimentales de rayos X por sincrotrón (Figura 3).

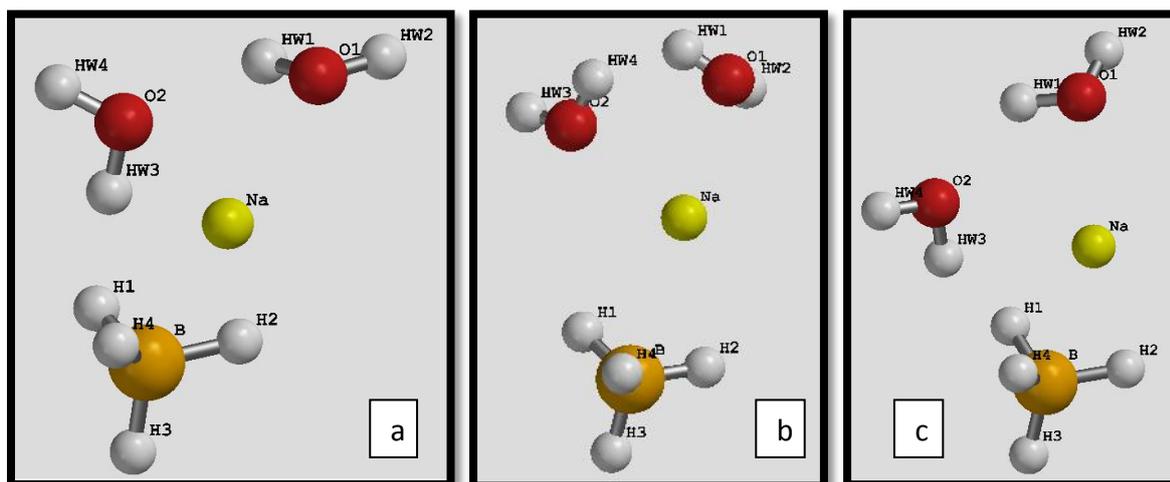


Figura 3: Estructuras moleculares del $\text{NaBH}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ derivado del análisis cristalográfico de sincrotrón (a) ⁷², y las posiciones relativas finales luego de realizar una optimización geométrica con cálculos DFT B3LYP/ 6-311++G(2df,2p) (b) y Møller -Plesset MP2/6-311++G** (c).

Luego de la optimización geométrica, los resultados encontrados por ambas teorías DFT y Møller- Plesset mostraron una buena coherencia en términos de distancias interatómicas y ángulos de enlace. Más aún, la variación de los valores fue leve respecto a la estructura experimental de partida (Tabla 1). Por su parte, la simulación de los espectros infrarrojos no presentaron bandas con componente de número complejo y en general los valores se mostraron correlativos con las señales experimentales. En suma, todos estos indicios sugieren que la elección del sistema inicial fue correcta y que la estructura optimizada alcanzó un mínimo de energía que concuerda con los datos experimentales.

Tabla 1: Distancias interatómicas (Å) y ángulos (°) de los átomos presentes en la molécula de NaBH₄·2H₂O.

	Distancias inter-atómicas (Å)			Ángulos (°)		
	exp. ^a	B3LYP 6-311++G(2df,2p)	MP2 6-311++G* *	exp. ^a	B3LYP 6-311++G(2df,2p)	MP2 6-311++G**
Na···B	2.953	2.506	2.442	H ₁ —B—H ₂	111.80	108.70
Na···H ₁	2.455	2.964	2.494	H ₁ —B—H ₃	106.78	109.24
Na···H ₂	2.571	2.150	2.206	H ₁ —B—H ₄	113.37	108.80
Na···H ₃	3.650	3.610	3.636	Hw ₁ —O ₁ —Hw ₂	105.45	107.28
Na···H ₄	3.795	3.156	2.258	Hw ₃ —O ₂ —Hw ₄	105.89	106.08
Na···O ₁	2.396	2.309	2.329	O ₁ —Na—O ₂	88.52	71.22
Na···O ₂	2.469	2.436	2.547	B—Na—O ₁	175.52	132.64
Na···Hw ₁	2.733	2.473	2.556	B—Na—O ₂	88.36	78.87
Na···Hw ₂	2.795	3.095	3.152			
Na···Hw ₃	2.892	2.473	2.483			
Na···Hw ₄	2.833	3.199	3.280			
B···H ₁	1.120	1.234	1.241			
B···H ₂	1.116	1.235	1.237			
B···H ₃	1.134	1.202	1.203			
B···H ₄	1.109	1.237	1.236			
O ₁ ···Hw ₁	0.791	0.971	0.969			
O ₁ ···Hw ₂	0.756	0.960	0.960			
O ₂ ···Hw ₃	0.762	0.990	0.978			
O ₂ ···Hw ₄	0.768	0.961	0.961			
Hw ₃ ···H ₁	3.290	1.544	1.666			
Hw ₄ ···H ₁	3.686	2.985	3.183			

De acuerdo con los cálculos teóricos (Tabla 2) las bandas agudas ubicadas a 3414 cm⁻¹, 3478 cm⁻¹ y 3553 cm⁻¹ corresponden a las vibraciones *stretching* de los grupos O-H y la banda débil a 3237 cm⁻¹ corresponden a los enlaces de di-hidrógeno entre el agua y el NaBH₄⁷². Las bandas centradas en 1618 cm⁻¹ y 1638 cm⁻¹ corresponden a las vibraciones *bending* del grupo H-O-H, sugiriendo nuevamente que ambas moléculas de agua interaccionan de forma diferente con el NaBH₄. Las bandas a 478cm⁻¹, 617cm⁻¹ corresponden a las vibraciones de "libración" del H₂O. Por su parte el NaBH₄ puede ser identificado por la banda intensa a 1126 cm⁻¹ (la cual aparece como resultado del solapamiento de vibraciones *wagging* y *scissoring*), conjuntamente con otra serie de bandas a 2224 cm⁻¹, 2291 cm⁻¹ y 2386 cm⁻¹ y 2594 cm⁻¹, las primeras tres correspondientes a varios modo *stretching* de los enlaces B-H del grupo BH₄; y la restante (a 2594 cm⁻¹) al modo *stretching* del grupo B-H₃. Respecto a esta

última banda, es relevante aclarar que para los casos de las muestras humedecidas (también para la muestra expirada) existe además una contribución de la absorbancia del metaborato (Figura 2). Por último, la ausencia de desdoblamiento del modo *wagging* es un indicativo de la simetría tetraédrica del grupo BH₄.

Tabla 2: Asignación de las bandas del espectro del NaBH₄ mediante las teorías DFT y la perturbación de Møller-Plesset .

Espectro experimental NaBH ₄ ·xH ₂ O	Cálculos Teóricos		
	B3LYP 6- 311++G(2df,2p)	Møller-Plesset MP2 6-311++G**	Asignación de bandas
478	487	438	BH ₄ rocking + OH libration del H ₂ O(1) y (2)
617	645	633	OH libration OH del H ₂ O(2)
	756	679	assym. twisting H ₂ O(2)
	1083	1142	BH ₄ wagging
	1130	1168	BH ₄ scissoring
1126	1180	1217	BH ₄ scissoring
	1232	1295	BH ₄ scissoring
	1302	1325	BH ₄ scissoring
1618	1621	1618	bending H ₂ O(1)
1638	1665	1673	bending H ₂ O(2)
2224	2239	2303	stretching B—H ₁ + B—H ₄
2291	2257	2317	asymmetric stretching B—H ₂ (B—H ₁ + B—H ₄) ^a
2386	2274	2327	symmetric stretching B—H ₄ (B—H ₁ + B—H ₂) ^a
2594	2505	2568	stretching B—H ₃
3237	3294	3593	stretching O(2)—H _{w3}
3414	3692	3795	stretching O(1)—H _{w1}
3478	3877	3941	stretching O(2)—H _{w4}
3553	3903	3971	stretching O(1)—H _{w2}

^a corresponden a las contribuciones adicionales de los modo de vibración *stretching* encontrados solamente con el método B3LYP/ 6-311++G(2df,2p).

El metaborato puede ser distinguido por la presencia de bandas de absorción a 880 cm⁻¹, 1018 cm⁻¹, 1339 cm⁻¹ y 1437 cm⁻¹. Las dos primeras corresponden al modo vibracional *stretching* y las restantes al modo *bending* del grupo B—O—H⁷³. Existe una clara correspondencia entre las señales del al metaborato de sodio tetrahidratado y las del borohidruro de sodio expuesto a diferentes niveles de humedad (Figura 2), lo cual evidencia la transformación del borohidruro en metaborato a través del proceso de hidrólisis. La relación entre las intensidades relativas de la banda del metaborato a 1437 cm⁻¹ y el máximo característico del NaBH₄ a 2291 cm⁻¹ puede ser utilizada como criterio de evaluación del estado del reactivo.

Tabla 3: Comparación de las bandas espectrales para la muestra de borohidruro anhídrido y para una muestra expirada. Las bandas marcadas corresponden a señales características del borohidruro de sodio, mientras que las bandas ausentes en la muestra de borohidruro anhídrido son atribuidas al metaborato.

NaBH ₄ (nuevo)		NaBH ₄ (expirado)	
Número de onda (cm ⁻¹)	Absorbancia normalizada	Número de onda (cm ⁻¹)	Absorbancia normalizada
478	0.30	478 ^a	0.13
617	0.29	617	0.12
		880 ^b	0.09
		1018 ^b	0.14
1126	0.72	1126	0.72
		1339 ^b	0.14
		1437 ^b	0.14
1618	0.38	1618	0.16
1638	0.26	1638 ^a	0.13
2224	0.69	2224	0.69
2291	1.00	2291	1.00
2386	0.33	2386	0.35
2594	0.04	2594	0.07
3237	0.13	3240	0.07
		3279	0.08
3414	0.64	3420	0.21
3478	0.54	3474	0.21
3553	0.43	3564	0.18

^ahombros

^bbandas del metaborato de sodio

Desarrollo del método para establecer la pureza del NaBH₄ por espectroscopía infrarroja

Si bien el análisis cualitativo permite una rápida e inequívoca detección del metaborato presente, la cuantificación del mismo por IR no es tan simple dado que las medidas son en fase sólida. La correcta aplicación de la ley de Lambert-Beer (que relaciona la absorbancia con la concentración de la muestra) requiere del conocimiento exacto del valor del camino óptico, lo cual es prácticamente imposible puesto que el espesor de la pastilla de KBr es muy delgado y varía significativamente en cada preparación de la pastilla. Asimismo existen otros factores que pueden variar entre medida y medida como la tortuosidad² de la pastilla,

²La tortuosidad es un término definido por el cociente entre la longitud promedio de los poros y el largo de la propia muestra de material poroso⁷⁴

la cual puede aumentar la cantidad de luz dispersada, la no homogeneidad en su tamaño, la presencia de huecos y las fluctuaciones de la humedad atmosférica y el CO₂. Todos estos factores, en mayor o menor medida, generan que no exista una relación constante entre la cantidad de muestra agregada y las intensidades de las señales infrarrojas.

Para solucionar el problema anterior se propone cuantificar la cantidad de borohidruro de sodio de forma relativa a la cantidad de metaborato. Para realizar este cometido, el método se basa en varios supuestos:

- I. Se considera que se cumple que el valor de la absorbancia característica de cada pico, es directamente proporcional a fracción de muestra presente, en otras palabras se trabaja en un rango de absorbancias, tal que se cumple la aditividad con la fracción de muestra presente (consideración análoga a la ley de Lambert-Beer).
- II. Se considera que las muestras, se encuentran homogéneamente distribuidas en toda la pastilla de KBr preparada.
- III. Se asume que las bandas a 1437 cm⁻¹ y 2291 cm⁻¹ son exclusivas de la presencia del metaborato y el borohidruro de sodio, respectivamente.
- IV. Se asume que durante el corto tiempo que lleva la medida no existen transformaciones significativas del borohidruro de sodio.
- V. Se considera que la reacción de transformación del borohidruro a metaborato es la única que da cuenta del deterioro del reactivo, dejando de lado la interferencia de cualquier otro tipo de reacción química que pudiera existir.

Asumiendo que se cumplen todas las consideraciones anteriormente mencionadas, el deterioro de la muestra de borohidruro de sodio puede ser calculado de forma relativa a la fracción molar de metaborato presente, relacionando estas fracciones con el cociente entre las intensidades de las señales características a 1437 cm⁻¹ y 2291 cm⁻¹. Como ambas señales se miden en simultáneo en una pastilla de KBr determinada, al realizar el cociente de las absorbancias, se cancelan los efectos inherentes a la morfología de la pastilla de KBr y a las fluctuaciones atmosféricas, permitiendo así determinar la pureza del reactivo.

Matemáticamente, el número de moles del metaborato y el borohidruro de sodio puede calcularse como:

$$n_{NaBO_2 \cdot 4H_2O} = \frac{m_{NaBO_2 \cdot 4H_2O}}{M_{NaBO_2 \cdot 4H_2O}} \quad (5)$$

$$n_{NaBH_4} = \frac{m_{NaBH_4}}{M_{NaBH_4}} \quad (6)$$

donde los $m_{NaBO_2 \cdot 4H_2O}$ y m_{NaBH_4} representan las masas reactivos pesados en cada medida, y $M_{NaBO_2 \cdot 4H_2O}$ y M_{NaBH_4} sus masas moleculares respectivas.

Luego, a partir de estos valores, puede calcularse las fracciones molares de cada reactivo como forma de expresión de la concentración:

$$f_{NaBO_2 \cdot 4H_2O} = \frac{n_{NaBO_2 \cdot 4H_2O}}{(n_{NaBH_4} + n_{NaBO_2 \cdot 4H_2O})} \times 100 \quad (7)$$

$$f_{NaBH_4} = \frac{n_{NaBH_4}}{(n_{NaBH_4} + n_{NaBO_2 \cdot 4H_2O})} \times 100 \quad (8)$$

De acuerdo con los supuestos I y III, la relación entre las absorbancias y las fracciones molares queda expresada como a través de la ley de Lambert-Beer:

$$A_{1437} = b \varepsilon_{1437} f_{NaBO_2 \cdot 4H_2O} \quad (9)$$

$$A_{2291} = b \varepsilon_{2291} f_{NaBH_4} \quad (10)$$

donde ε_{1437} y ε_{2291} hacen referencia al coeficiente de proporcionalidad (equivalente a la absorptividad molar) para cada número de onda medido y b es el camino óptico, el cual es el mismo para ambas bandas de absorción por obtenerse sobre una misma pastilla de KBr.

Luego la relación de absorbancias queda definida por:

$$\frac{A_{1437}}{A_{2291}} = \frac{\varepsilon_{1437}}{\varepsilon_{2291}} \left(\frac{f_{NaBO_2 \cdot 4H_2O}}{f_{NaBH_4}} \right) = \frac{\varepsilon_{1437}}{\varepsilon_{2291}} \frac{n_{NaBO_2 \cdot 4H_2O}}{n_{NaBH_4}} \quad (11)$$

donde la suma de las fracciones es igual a la totalidad de la muestra:

$$f_{NaBO_2 \cdot 4H_2O} + f_{NaBH_4} = 1 \quad (12)$$

Luego, sustituyendo las ecuaciones 12,11; la relación entre las absorbancias medidas y la relación molar del borohidruro de sodio es:

$$\frac{A_{1437}}{A_{2291}} = \frac{\epsilon_{1437}}{\epsilon_{2291}} \left(\frac{1 - f_{NaBH_4}}{f_{NaBH_4}} \right) \quad (13)$$

A partir de la ecuación 13, con los datos del espectro es posible despejar la fracción de borohidruro de sodio, que a su vez también puede escribirse en términos de porcentaje como:

$$f_{NaBH_4} \times 100 \quad (14)$$

La Figura 4 muestra los resultados de la curva de calibración obtenida. La pendiente determinada para los valores que ajustan al rango lineal fue de $\frac{\epsilon_{1437}}{\epsilon_{2291}} = 0.54 \pm 0.03$. Por su parte el apartamiento de la linealidad, observado para las relaciones molares por encima de 0.8, se atribuye a las desviaciones clásicas de la ley de Lambert-Beer, para concentraciones de muestras altas.

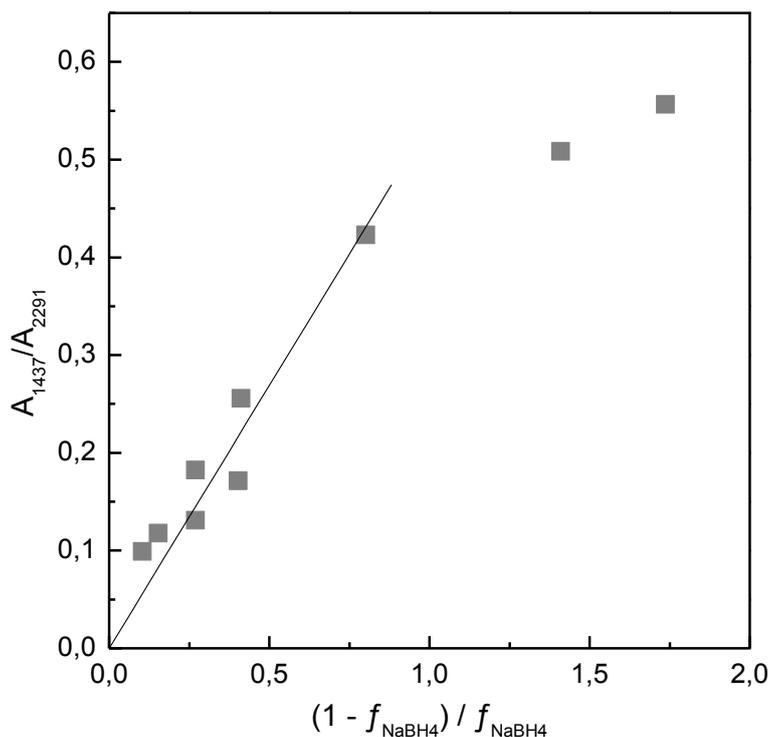


Figura 4: Curva de calibración del NaBH₄ medido por FTIR, de acuerdo con la Ec. 13. Adaptado de referencia⁶⁹.

La principal ventaja de esta técnica es que se realiza en fase sólida, lo cual soluciona en gran medida las reacciones indeseadas de hidrólisis y oxidación del borohidruro. Aunque es posible que el polvo de NaBH₄ llegue a reaccionar con la humedad del ambiente, gracias al corto tiempo de análisis estos problemas son despreciables especialmente si se tienen ciertos cuidados mínimos de trabajar en atmósfera con humedad reducida y si el transporte de las muestras se realiza en sistemas cerrados. La otra gran ventaja de la técnica es que no requiere de grandes cantidades de reactivo, basta con unos pocos miligramos para poder evaluar el estado del reactivo, a diferencia de la titulación iodimétrica que depende de una reacción química y valoración por bureta, que consume grandes cantidades de reactivos para medidas con grado de precisión analíticas.

Entre sus desventajas, se encuentran los cuidados que se deben llevar a la hora del procesamiento de los espectro medidos. En este sentido es importante el secado de las muestras, aún en estado sólido, dado que muestras de borohidruro húmedo pueden dar lugar espectros deformados, con baja resolución de las señales (Figura 5).

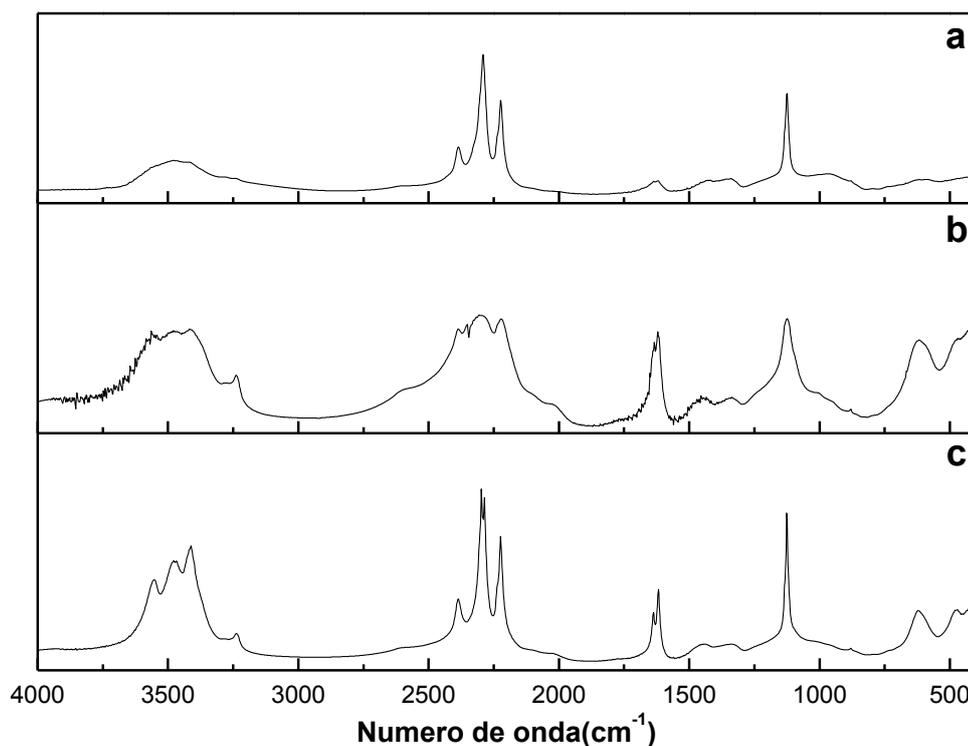


Figura 5: Efecto de la humedad sobre los espectros infrarrojos de las muestras de borohidruro: Muestra de NaBH_4 expirado luego de ser secado en estufa durante 24hs a 80°C (a) NaBH_4 expirado sin secar (b) y NaBH_4 anhidro humedecido durante 2 días a 78% HR (c). El proceso de secado elimina las moléculas de aguas absorbidas, dejando solamente las aguas de hidratación de las muestras, lo que se traduce en bandas agudas, con mayor resolución.

Es importante aclarar también que el método analítico desarrollado es semi-cuantitativo, en el sentido que no es posible determinar la pureza del reactivo de forma absoluta, teniendo en cuenta otros contaminantes o al propio hidrógeno que se depende en el proceso de descomposición. En su lugar brinda un dato cuantitativo relativo al porcentaje de metaborato presente. Sin embargo, es indiscutible que el método es especialmente cómodo y útil para el control del grado de deterioro del reactivo.

Validación del método

La puesta a prueba del método de cuantificación por espectroscopía infrarroja se realizó sobre una muestra de borohidruro expirada, comparando los resultados obtenidos con otras dos técnicas, una de base electroquímica y otra consistente en una iodometría clásica.

El espectro FTIR medido de la muestra expirada se mostró igual a los espectros de las muestras humedecidas, identificándose las bandas características del borohidruro de sodio, conjuntamente con las bandas del borato a 880 cm^{-1} , 1018 cm^{-1} , 1339 cm^{-1} and 1437 cm^{-1} (Figura 6).

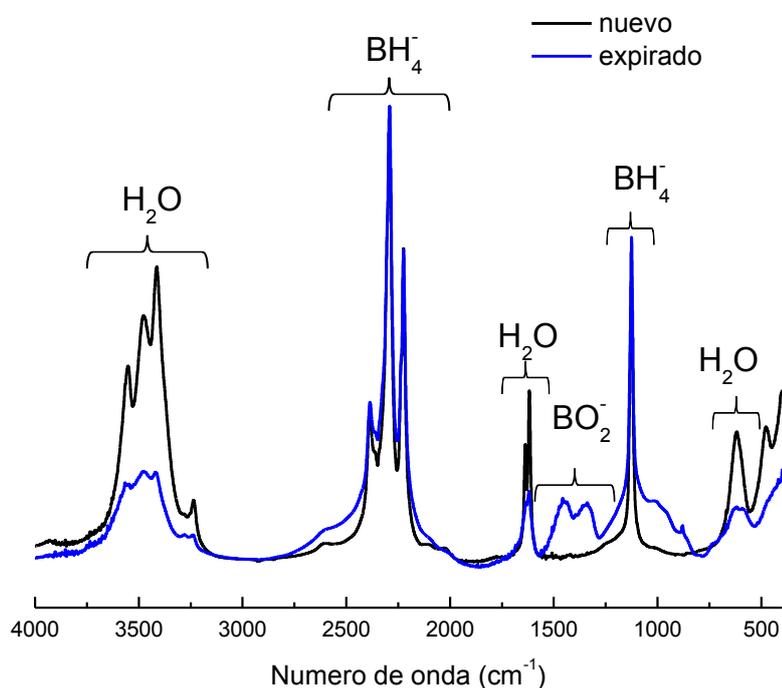


Figura 6: Espectro FTIR de la muestra de NaBH₄ anhidro (negro) y expirado (azul). Ambos espectros fueron normalizados asignando un valor de 1.00 a la banda característica del borohidruro a 2291 cm^{-1} . Adaptado de referencia ⁶⁹.

Aplicando el método de cuantificación sobre la muestra expirada, se obtuvo un valor de pureza del 81% mol (rango 78-83%, $n=5$). Esto indica que el método detecta alrededor de un 17% mol (rango 15-20%) de impureza bajo la forma de metaborato de sodio, respecto al 98% borohidruro puro. Para conocer si el espectro de una muestra de borohidruro podía explicarse a partir de los espectros sumados de borohidruro y metaborato, se sumaron ambos espectros variando el peso relativo de cada uno (Figura 7); manteniendo una relación de proporcionalidad 1:0.15 entre el NaBH₄ y el NaBO₂ · 4H₂O, mostrándose un solapamiento casi perfecto con el espectro experimental.

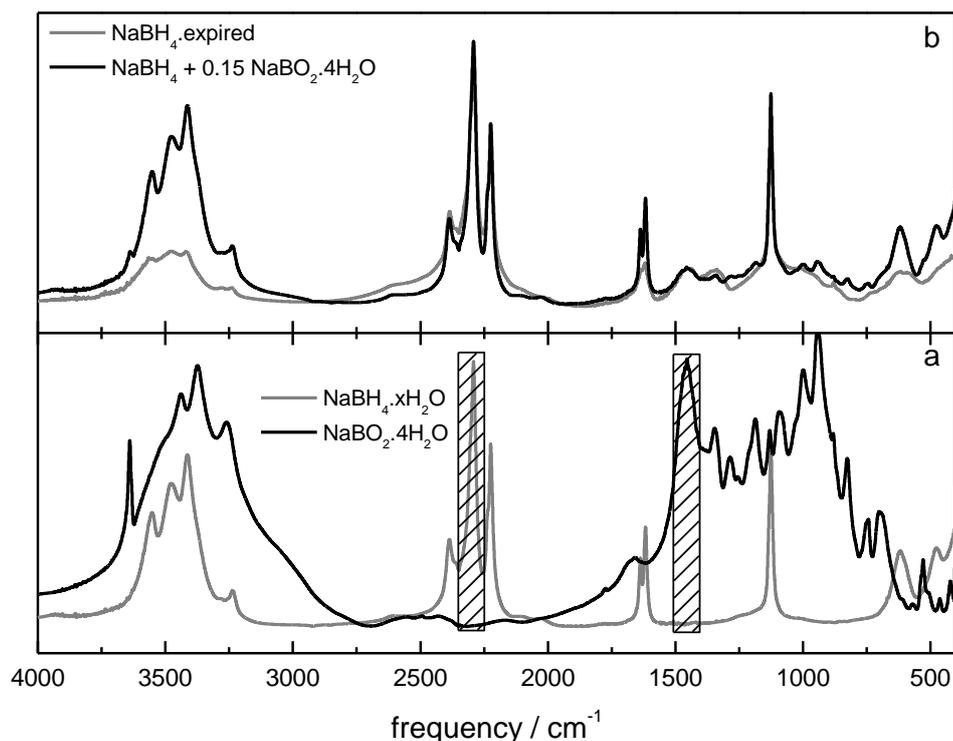
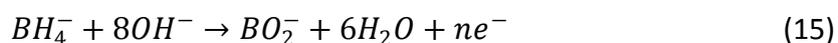


Figura 7: Espectro FTIR de la muestra de NaBH₄ puro (gris) y NaBO₂·4H₂O (negro). Las áreas marcadas representan las bandas a 2291cm⁻¹ y 1437 para el NaBH₄ y el NaBO₂ respectivamente, utilizadas para el cálculo de proporción de cada sustancia. Adaptado de referencia ⁶⁹.

Determinación electroquímica de la pureza del borohidruro de sodio

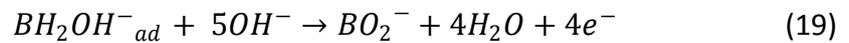
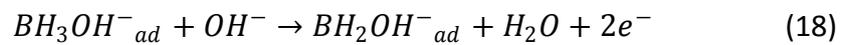
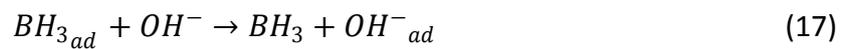
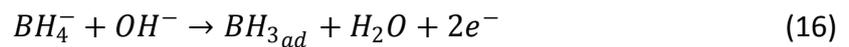
Existen varios métodos electroanalíticos para la determinación de la pureza del borohidruro, entre los que se destacan las medidas de potencial abierto y voltamperométricas^{65,75-76}. Todas estas técnicas tienen en común la utilización de un medio fuertemente alcalinos (pH >12):



El medio básico garantiza que el reactivo se consuma exclusivamente mediante el proceso de oxidación, dado que en estas condiciones la reacción competitiva de hidrólisis se

enlentece. De cualquier forma el número de electrones intercambiados son generalmente más bajos al valor esperado de 8^{75,77-78}, lo cual sugiere que en parte no se logra evitar completamente la reacción de hidrólisis. Algunos autores incluso sostienen que la presencia de metaborato podría afectar también la transferencia electrónica cambiando el perfil voltamperométrico del proceso de oxidación⁷⁹.

En todos los casos, la reacción de oxidación electroquímica global expresada en la ecuación 15 puede dividirse en varias etapas que dan cuenta de la existencia de un mecanismo complejo:



La velocidad de la reacción electroquímica global queda determinada por la etapa lenta de la reacción, y se expresa a través de la densidad de corriente (j_p), que varía linealmente con la concentración de borohidruro de sodio de acuerdo con la ecuación:

$$j_p = 2.99 \times 10^5 [(1 - \alpha)n_\alpha D_{BH_4^-}]^{\frac{1}{2}} n C_{BH_4^-}^* \quad (20)$$

donde α representa el coeficiente de transferencia de carga, n_α el número de electrones intercambiados en el paso determinante (lento), n el número de electrones del proceso global, $D_{BH_4^-}$ el coeficiente de difusión de los iones BH_4^- y $C_{BH_4^-}^*$ la concentración de BH_4^- .

De acuerdo con el trabajo de Santos and Sequeira⁶⁵ es posible obtener una aproximación de la pendiente del gráfico de j_p vs. $C_{BH_4^-}^*$ a partir de datos teóricos donde se considera $\alpha = 0.84$, $n = 7.6$ y $D_{BH_4^-} = 2.4 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. Asimismo, considerando la ecuación 16 como el paso determinante del mecanismo planteado, el valor del número de electrones intercambiados queda en: $n_\alpha = 2$. Con estos valores, se obtiene que el valor de la pendiente calculada es de 1.99 ALmol^{-1} . Este valor ajusta bastante bien los datos de la curva de calibración experimental (Figura 8), lo cual de cierta forma verifica el mecanismo de

reacción planteado, con la transferencia de 8 electrones en el proceso global. Sin embargo, a la hora de utilizar la curva de calibración para la determinación de la concentración efectiva del NaBH_4 se optó por adoptar un ajuste a un polinomio de segundo orden de acuerdo con la ecuación:

$$j_p = 2.3470C_{\text{BH}_4^-}^* - 0.03416(C_{\text{BH}_4^-}^*)^2 \quad (21)$$

El coeficiente de correlación lineal alcanzado por este ajuste fue de $r^2 = 0.9994$ (Figura 7). Si bien la ecuación 21 no posee significado físico, permite estimar con mayor exactitud el valor de concentración de una muestra de borohidruro problema, al tiempo que da cuenta de la complejidad del proceso de descomposición cuyo mecanismo se acerca bastante al descrito por la ecuación lineal, pero que a medida que la concentración de BH_4^- aumenta se observa una desviación de la tendencia lineal.

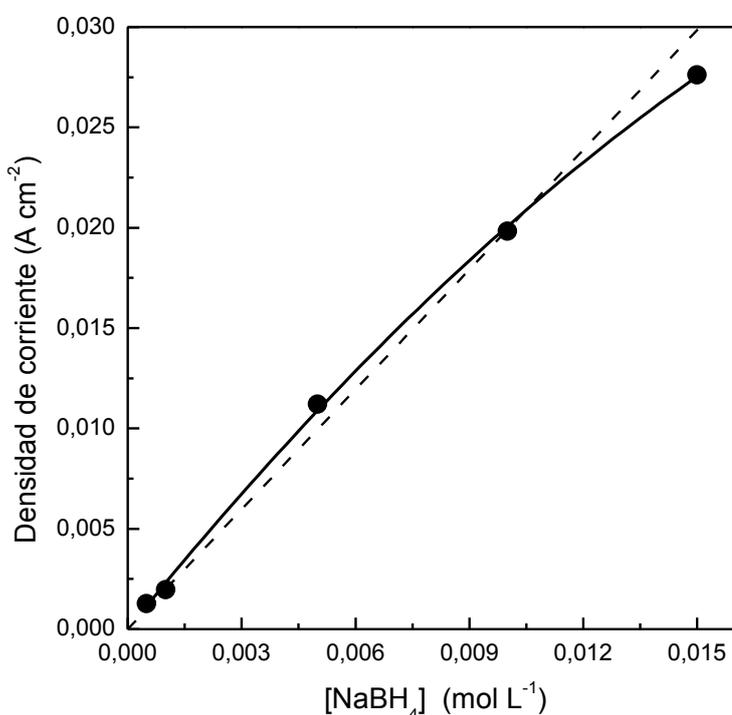


Figura 8: Curva de calibración para la determinación voltamperométrica de la pureza del NaBH_4 . En línea punteada se marca la predicción teórica lineal descrita en la ecuación 20 y la línea sólida corresponde al ajuste de los datos experimentales a la función polinomial expresada en la ecuación 21.

Utilizando el ajuste polinomial se determinó que la pureza del borohidruro expirado fue de 86.3% mol (76.4-92.9%, $n=5$).

Una de las principales desventajas del método electroquímico es la competencia de los procesos de oxidación e hidrólisis del borohidruro en solución acuosa, aun retardando la reacción por el empleo de un pH básico⁶⁴. Tampoco se descarta la existencia de un procesos catalítico sobre la superficie del electrodo de trabajo debido al pasaje de corriente. Sumado a esto, los intermediarios generados en la reacción electroquímica pueden dar lugar a múltiples contribuciones que pueden afectar de forma desigual la intensidad del pico farádico medida⁸⁰, generando que el proceso de oxidación electroquímico del borohidruro no sea una propiedad aditiva en todo el rango de concentraciones. Desde el punto de vista experimental este fenómeno se observa en una variación no proporcional de la altura de los picos, mientras que los ligeros corrimientos en la posición del voltamperograma se atribuye a la irreversibilidad del proceso (Figura 9).

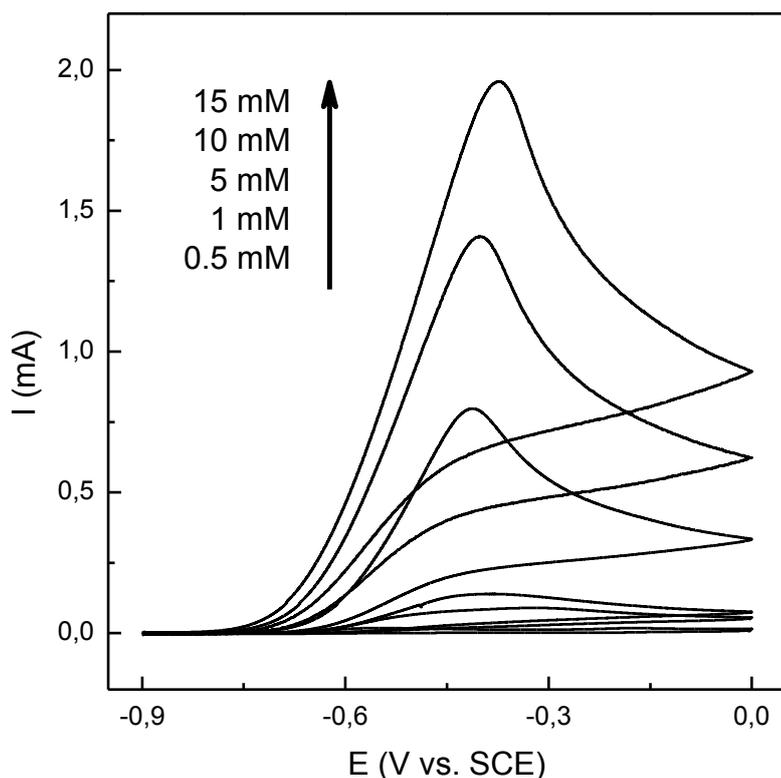


Figura 9: Voltamperograma para la oxidación irreversible del NaBH_4 a concentraciones en el rango de 0.5-15 mM. Adaptado de referencia ⁶⁹.

Determinación de la pureza del borohidruro de sodio por iodometría

El método de titulación iodimétrico es la técnica analítica considerada de referencia⁶⁴. Es una técnica de análisis robusta que pese al paso del tiempo, aún no ha sido sustituida por otro método. En el trabajo original ⁶⁴, los autores muestran que incluso empleando concentraciones fuertemente básicas, no se inhibe de forma completa la hidrólisis del borohidruro afectando negativamente la calidad de los resultados de las titulaciones iodimétricas. A esto se debe sumar un tiempo de análisis relativamente largo, la necesidad de cronometrar exactamente algunas etapas de la determinación, el alto consumo de reactivos y la inestabilidad química de los reactivos para tiempos prolongados de medida.

Una de las grandes ventajas en comparación a los anteriores es que la pureza es expresada en función de la masa total pesada del compuesto, por lo que no requiere de una curva de calibración previa y la pureza queda expresada en términos absolutos, es decir, tiene en cuenta cualquier otro contaminante que se encuentre presente en la muestra de estudio.

Al igual que en las determinaciones electroquímicas se debe utilizar un medio alcalino para retardar el proceso de hidrólisis, el cual, sin embargo, no logra evitar completamente. Sumado a esto, el gas hidrógeno liberado en la descomposición (Ec.3) del borohidruro es generalmente despreciado de las medidas, por lo que la pureza determinada puede ser ligeramente sobreestimada. Dado que la pureza determinada se expresa en función de la masa total pesada de muestra, no brinda información del proceso concreto de descomposición del borohidruro, pudiendo incluirse el agua de hidratación como una impureza del reactivo. En este sentido tras el análisis de la muestra de borohidruro anhidro, se encontraron diferencias respecto al dato de referencia reportado por el fabricante ($\geq 98.8\%$), siendo los valores experimentales obtenidos en el laboratorio de 93.2% m/m (rango de 91.4-94.8%, $n=5$), y 82.8% m/m (rango de 75.0-89.1%, $n=6$) para el caso del NaBH_4 nuevo y expirado, respectivamente. Como se detalla más adelante este 5.6% de diferencia es atribuido a la presencia de las aguas de cristalización aún en la muestra supuestamente anhidra.

Análisis comparativo de las distintas técnicas

La Tabla 4 resume los resultados comparados de las diferentes técnicas empleadas, así como también algunas de las ya mencionadas ventajas y desventajas de cada método.

El primer dato importante que se observa es que los tres valores promedio de pureza del reactivo, fueron concordantes, lo cual valida entre sí los resultados obtenidos por los distintos métodos.

La segunda conclusión que se desprende es que las tres técnicas son complementarias, permitiendo en el análisis combinado tener el panorama completo del estado del reactivo. Por ejemplo, de la titulación iodométrica del reactivo fresco (NaBH_4 anhidro 98.8%) se desprende que el 93.2% de la masa total corresponde al borohidruro de sodio, y de acuerdo

con el espectro FTIR, no se detecta banda alguna de metaborato, pero sí la presencia de bandas agudas en la región de las vibraciones de los O-H a *ca.* 3500 cm^{-1} . En consecuencia, es lógico suponer que el 5.6% restante corresponde a las aguas de hidratación que se generan por el contacto del reactivo con la humedad atmosférica (Ec.1) del laboratorio (RH<40%) durante la preparación de las pastillas de KBr. Esto denota la rápida adsorción de agua que tiene lugar sobre el borohidruro de sodio previo a su oxidación⁷⁰.

Finalmente es importante notar que de entre todas las técnicas empleadas, el método propuesto es el único que evalúa el compuesto en su estado sólido, que como quedó demostrado es el único que minimiza los procesos de hidrólisis .

Tabla 4: Principales ventajas y desventajas de cada una de las técnicas presentadas.

Técnica	Determinación de la pureza del reactivo	Ventajas	Desventajas
Voltamperometría	86.3% mol (rango: 76.4 – 92.9 %, $n = 5$).	<ul style="list-style-type: none"> Alta sensibilidad. Aunque la pureza del reactivo se expresa en función de la relación molar entre el NaBH_4 y el NaBO_2, tiene la ventaja de detectar impurezas electroactivas. 	<ul style="list-style-type: none"> Competencia entre los procesos de oxidación e hidrólisis. Existencia de un posible efecto catalítico en el ánodo del electrodo. Requiere una curva de calibración. Es una técnica lenta. La pureza del reactivo se expresa en función de la relación molar entre el NaBH_4 y el NaBO_2.
Iodometría	82.8 % w/w (rango: 75.0 – 89.1 %, $n = 6$)	<ul style="list-style-type: none"> No requiere una curva de calibración. La pureza se expresa sobre la masa total pesada y por tanto el método toma en cuenta otras impurezas aparte del NaBO_2. 	<ul style="list-style-type: none"> Es una técnica lenta. Entre los principales problemas se destaca la inestabilidad del NaBH_4 en solución acuosa.
FTIR	81 % mol (rango: 78 – 83 %, $n = 5$).	<ul style="list-style-type: none"> Es la técnica más rápida y sencilla. Las medidas se realizan de forma directa sobre la muestra sólida. Aunque la pureza del reactivo se expresa en función de la relación molar entre el NaBH_4 y el NaBO_2, tiene la ventaja de detectar impurezas visibles en el infrarrojo. 	<ul style="list-style-type: none"> Requiere una curva de calibración La pureza del reactivo se expresa en función de la relación molar entre el NaBH_4 y el NaBO_2.

Análisis del producto de descomposición

En la naturaleza, el metaborato de sodio puede presentarse bajo diferentes formas cristalinas dependiendo de las condiciones de síntesis⁸¹, por lo que se realizaron medidas de XRD para determinar la estructura molecular del producto de descomposición oxidación del NaBH_4 .

De acuerdo con la base de datos disponible (153293-ICSD-PXRD), el diagrama perfil de difracción de rayos X para el NaBH_4 anhidro presenta 6 picos característicos a 25.13° , 29.02° , 41.5° , 49.12° , 51.45° y 60.18° (Figura 10).

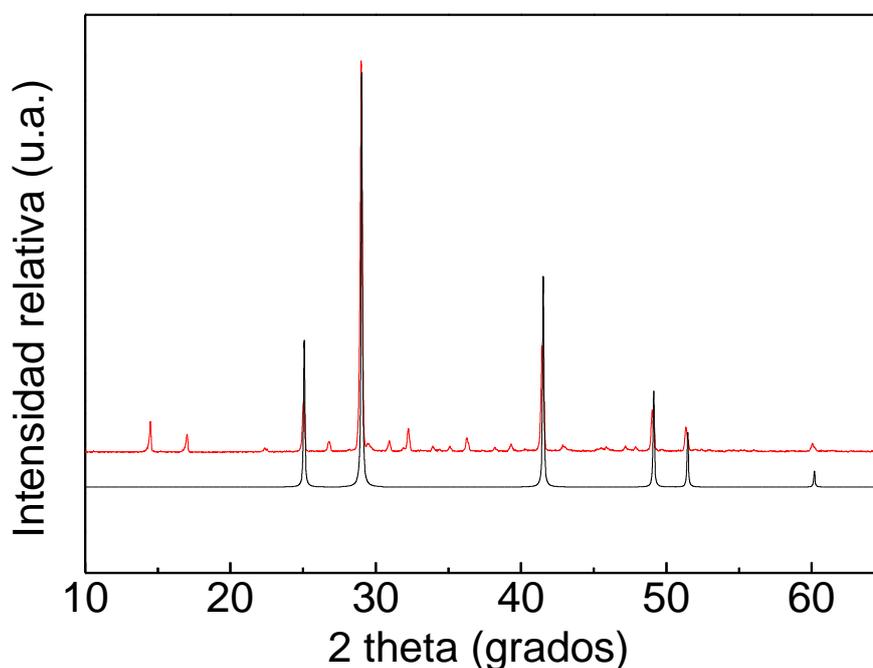


Figura 10: XRD de la muestra de NaBH_4 anhidra experimental (rojo) y NaBH_4 obtenido de de la base de datos 153293-ICSD-PXRD (negro).

Los mismos picos son identificados en la muestra de NaBH_4 puro (Figura 11), conjuntamente con otros picos de menor intensidad. Estos últimos son adjudicados a una reacción parcial con la humedad del ambiente durante la molienda del reactivo. La evidencia más clara de esto son los picos observados a 14.67° y 17.19° , señales que aparecen en el $\text{NaBH}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

(Figura 11) con gran intensidad. En comparación, la baja intensidad de las señales observadas en la Figura 10 indican que el NaBH_4 puro se encuentra parcialmente hidratado ($\text{NaBH}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$, con $x \ll 2$), lo cual es coherente dado que esta hidratación solamente proviene del tiempo de exposición a la humedad ambiente. Por su parte la pérdida de alguna de las señales intensas observadas solamente en la muestra experimental posiblemente se deba a los cambios conformacionales de la molécula en presencia de aguas de hidratación.

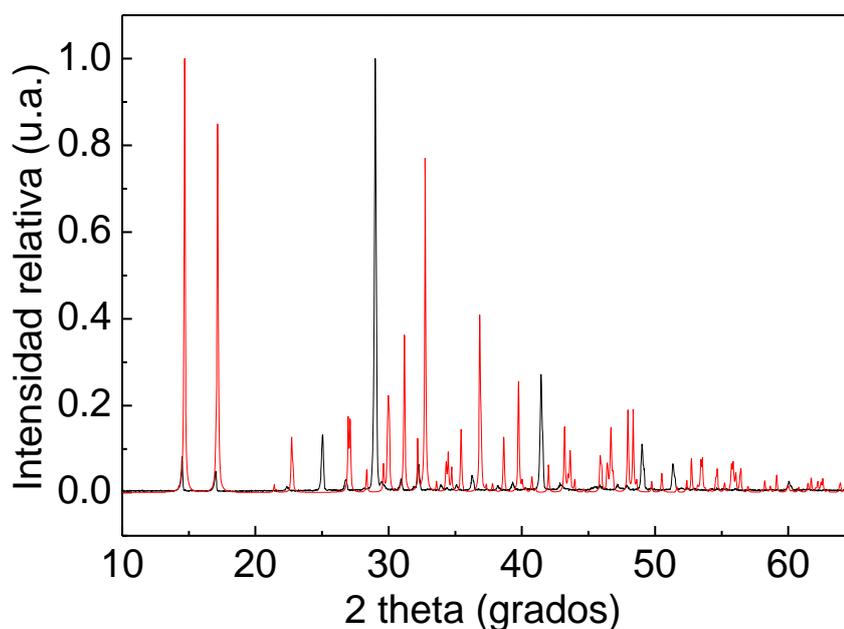


Figura 11: XRD de la muestra de $\text{NaBH}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (rojo) y la muestra experimental de NaBH_4 puro (negro).

De forma similar, los perfiles de los difractogramas del metaborato, cambian levemente dependiendo del grado de hidratación de la muestra, tal es así que algunos picos característicos, (32.29° , 33.46° , 37.82° y 43.70°) se muestran con menor intensidad en la muestra seca (Figura 12).

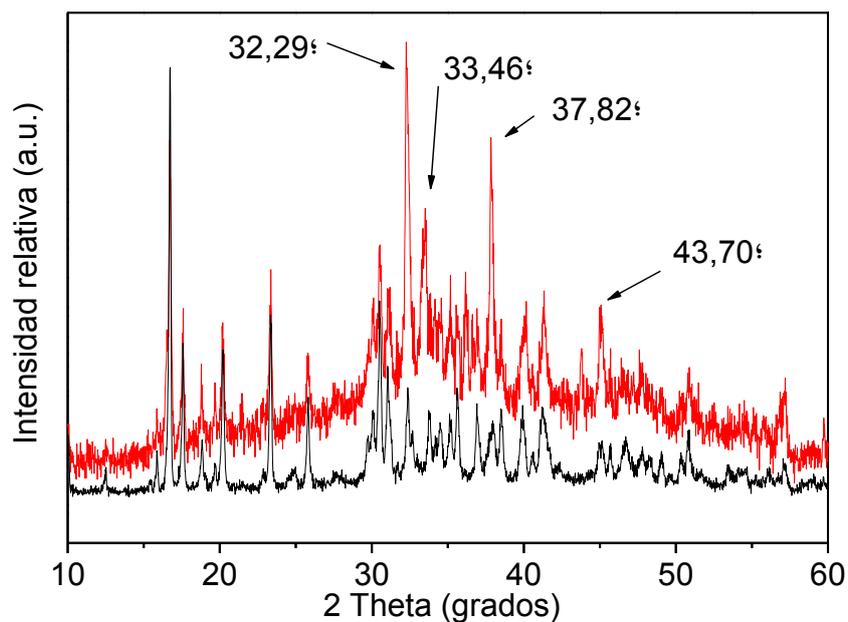


Figura 12: Difractogramas para el metaborato de sodio seco (negro) y humedecido en atmósfera a 98% HR durante 24 horas (rojo).

Cabe aclarar además que algunas de las señales del $\text{NaBH}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (419041-ICSD-PXRD) aparecen ligeramente corridas con respecto a la muestra medida, hecho que puede explicarse por diferencias en el empaquetamiento de la muestra y/o calibración del instrumento de medida. La diferencia en las intensidades relativas se atribuye a la existencia de orientaciones cristalinas preferenciales causadas por un empaquetamiento de la muestra heterogéneo, por el ensanchamiento de los picos el cual depende del tamaño del grano de polvo y/o por variaciones en la humedad relativa de la muestra durante la medida.

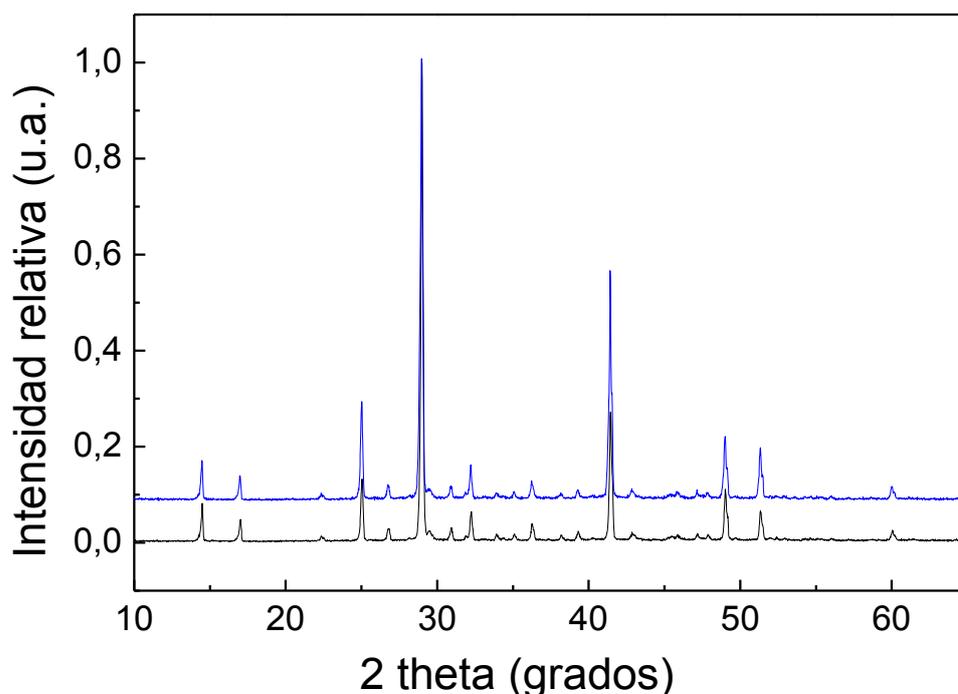


Figura 13: XRD de la muestra de NaBH_4 sometida durante 4 horas a 70% HR (azul) y la muestra de NaBH_4 "anhidro" (negro).

Por su parte los diagramas de difracción las muestras de NaBH_4 humedecidas mostraron diferentes perfiles dependiendo del grado de humedad de las mismas: El diagrama de la muestra humedecida durante 4 hs a 70% HR es idéntico al diagrama del NaBH_4 "anhidro", lo cual indica que para este caso solamente se produjo la reacción de hidratación y/o una leve descomposición parcial de la muestra, dado que no aparecen las señales propias del borato (Figura 13). Por su parte el diagrama de la muestra sometida a condiciones de saturación de humedad presenta claras diferencias con respecto al NaBH_4 "anhidro", indicando un alto grado de avance de la reacción de oxidación del reactivo. Esta diferencia en el perfil tan remarcable se explica por la aparición de las señales del metaborato bajo la forma de tincalconita. La Figura 14 compara el perfil del NaBH_4 (3 días, 98% HR) con los perfiles de la tincalconita y NaBH_4 "anhidro" y el NaBO_2 de la base de datos 72913-ICSD-PXRD mostrando una correlación de las señales del NaBH_4 (98% HR) con la tincalconita, evidenciando claramente la presencia de la primera como producto final de la descomposición del NaBH_4 en agua. La tincalconita ($\text{Na}_2(\text{B}_4\text{O}_5(\text{OH})_4)(\text{H}_2\text{O})_{2.668}$) posee una celda unidad romboédrica de grupo espacial R32 (Figura 15). Estos resultados confirman los trabajos reportados por Stepanov sobre estudios de estabilidad del borohidruro de sodio⁸².

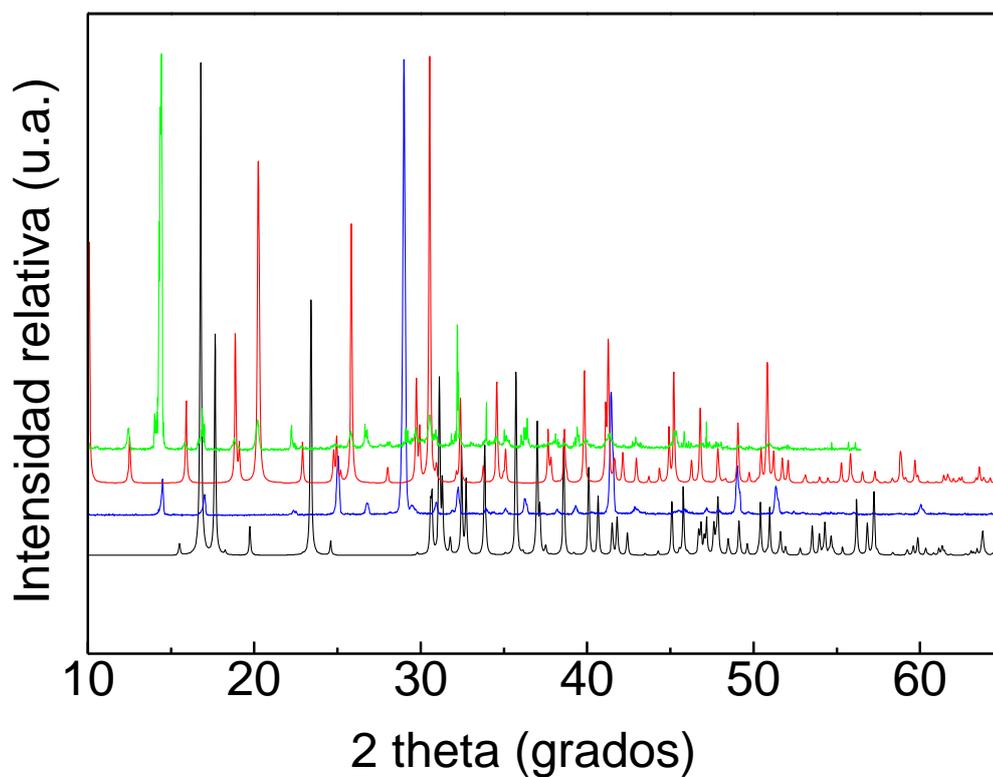


Figura 14: XRD de las muestra de NaBH₄ en humedad saturada 98 % HR-3 días (verde), NaBH₄ anhidro experimental (azul), tincalconita (rojo) y diagrama del borato de sodio obtenido de la base de datos 72913-ICSD-PXRD (negro).

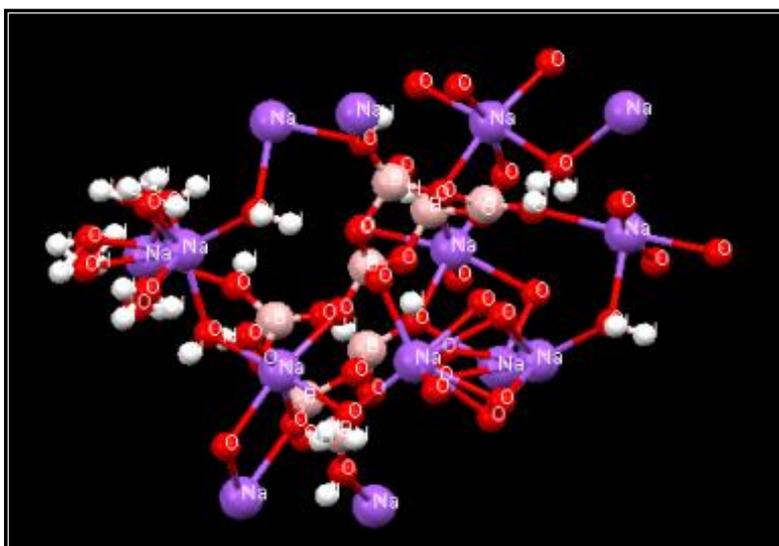


Figura 15: Estructura química de la tincalconita $\text{Na}_2(\text{B}_4\text{O}_5(\text{OH})_4)(\text{H}_2\text{O})_{2.668}$

3.4 Conclusiones

En esta etapa se desarrolló un método original, de cuantificación de la pureza del borohidruro de sodio por espectroscopía infrarroja. Contrario a las técnicas existentes, el método propuesto tiene la ventaja de ser rápido, sencillo y de evaluar la muestra en su propio estado sólido, evitándose las interferencias de reacciones no deseadas, como la hidrólisis de la muestra que ocurre en medios acuosos. Los cálculos teóricos realizados permitieron describir en profundidad el sistema de estudio, ayudando a diferenciar de forma clara las bandas de FTIR correspondientes al borohidruro y el metaborato de sodio. Por último los análisis de cristalografía permitieron identificar de forma inequívoca la presencia de tinalconita como la forma cristalina preferencial en la cual se encuentra el metaborato que surge de la descomposición del borohidruro.

Capítulo IV: Química de las nanopartículas de plata

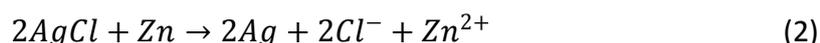
4.1 Naturaleza química de la plata

La plata es el elemento químico de número atómico 47, cuyo símbolo "Ag" proviene del latín *Argentum*, que significa "brillante". Es un metal blanco resplandeciente, blando, dúctil y maleable, utilizado desde antaño para acuñar monedas, al igual que sus vecinos, el cobre y el oro. De acuerdo con la tabla periódica de Mendeleiev, es un metal de transición cuya configuración electrónica $[\text{Kr}] 4d^{10}5s^1$ define el estado de oxidación +1 como principal. Con el oro y el cobre comparte algunas de sus propiedades físicas, como los valores altos en la energía de ionización, que dificulta la formación de cationes. Es por esto que en solución presenta una moderada resistencia a los ácidos y a las bases, aunque es susceptible al ataque del cianuro, el sulfuro y los sulfhidrilos. Presenta una baja tendencia a perder más de un electrón, por lo que son muy raros los compuestos en donde la plata actúa con número de oxidación +2 como es el caso del AgF_2 ^{83,84}.

La sal más común del metal es el nitrato de plata, el cual puede obtenerse fácilmente reduciendo el metal con ácido nítrico:



En presencia de los halogenuros forma sales insolubles en agua como el cloruro, bromuro, yoduro y fluoruro de plata. La plata metálica también puede regenerarse utilizando al zinc de acuerdo a las siguientes reacciones:



Todos los haluros de plata son sensibles a la luz, la cual desencadena la descomposición del compuesto generando la plata metálica. Esta propiedad ha sido explotada por la fotografía, en el revelado de imágenes: La exposición de bromuro de plata a una fuente luminosa origina la reducción de la plata, produciendo los píxeles negros en las zonas expuestas de la

hoja fotográfica gelatinizada con bromuro de plata³. Al día de hoy se sigue utilizando este método en el revelado de fotografías profesionales.

4.2 Síntesis de las nanopartículas de plata

En materia de síntesis de nanopartículas la bibliografía es extensa⁸⁵, existiendo una infinidad de técnicas con distintos agentes de recubrimiento, para fabricar casi cualquier tamaño y forma que se desee. Más aun, en los últimos años se han publicado varios trabajos donde se presentan métodos de biogénesis de nanopartículas, con agentes de recubrimiento muy poco convencionales utilizando microorganismos y/o extractos de plantas^{86, 87-88}.

Una revisión de los artículos publicados muestran que los métodos de síntesis de nanopartículas de plata siguen la estrategia *bottom up*, principalmente atribuida a la complejidad y a las imperfecciones que generan las estrategias *top down*^{42,89}. Los métodos *bottom up* se basan en el autoensamblado de las moléculas que ocurre a escala atómica y molecular, permitiendo la formación de nanoestructuras a partir de los precursores básicos: una sal de plata, un agente reductor y un agente de protección que estabiliza al coloide. Dentro del primero, el más utilizado es el nitrato de plata debido a su bajo costo y estabilidad química. El agente reductor, normalmente disuelto en solventes acuosos, es más variado, existiendo una preferencia por el borohidruro de sodio (ca. 23% de los artículos publicados) y el citrato de sodio (10%)⁸⁹. La razones fundamentales de esta selección derivan en parte de la historia de la síntesis de nanopartículas, dónde los primeros métodos empleados surgen a partir de los trabajos de Turchevich, Yonezawa y Kunitake^{90,91} donde se obtenían nanopartículas de 20 nm de diámetro a partir de reflujo de la sal en citrato, el cual actuaba como agente reductor y estabilizante al mismo tiempo. En la búsqueda de técnicas más simples y que no necesitaran temperaturas elevadas, aparece entonces la técnica de Brust y Schiffrin⁹² desarrollando por primera vez un método de síntesis de nanopartículas a temperatura ambiente cambiando al citrato por un agente reductor mucho más potente: el borohidruro de sodio (NaBH₄). La nueva técnica permitió reducir aún más el tamaño de las nanopartículas llegando a lograrse diámetros de entre 1 y 3 nm, simultáneamente

³ Los agregados formados hoy lo identificaríamos como nanopartículas de plata.

mejorando la estabilidad al trabajar en condiciones de baja temperatura⁹³. Mientras que los primeros métodos de síntesis utilizaban el NaBH_4 en exceso, las técnicas para la síntesis de nanopartículas con formas específicas depende de un control cinético sensible a la cantidad de agente reductor y a los ligandos estabilizantes presentes⁶³.

El uso de agentes estabilizantes o surfactantes es aún más variado, pudiendo clasificarse a grandes rasgos en función del mecanismo de protección, distinguiéndose entre los electrostáticos, los estéricos, los electroestéricos y los covalentes. La elección de uno u otro depende de la aplicación que se requiera y no existe un criterio único de selección⁴. El citrato de sodio, el dodecil sulfosuccinato de sodio (NaAOT) y la polivinil pirrolidona (PVP) son algunos de los más utilizados.

El agente estabilizante conjuntamente con el agente reductor, determinan el tamaño y la morfología de las nanopartículas sintetizadas. Para el caso de la síntesis de nanopartículas de plata, la relación entre el $\text{AgNO}_3/\text{NaBH}_4$ definen el tipo de control prevalente en la síntesis: cinético o termodinámico. El último caso ocurre cuando se agrega una concentración en exceso de NaBH_4 , acelerando el proceso de síntesis para formar esferas, dado que la misma minimiza la energía de Gibbs de superficie por presentar una menor relación área/volumen de partícula⁹⁴. En el caso contrario cuando el NaBH_4 se encuentra en defecto, la cinética química es más lenta y por tanto la síntesis pasa a operar bajo un control cinético donde el agente estabilizante presenta un rol fundamental al unirse de forma diferencial a los planos cristalinos de las partículas, permitiendo que algunas caras crezcan con mayor predominancia frente a las otras, formando nanopartículas planas (Figura 1)^{63,95}.

⁴ En el capítulo VII se describe un método termodinámico el cual puede ser utilizado como criterio de evaluación de la estabilidad de los coloide.

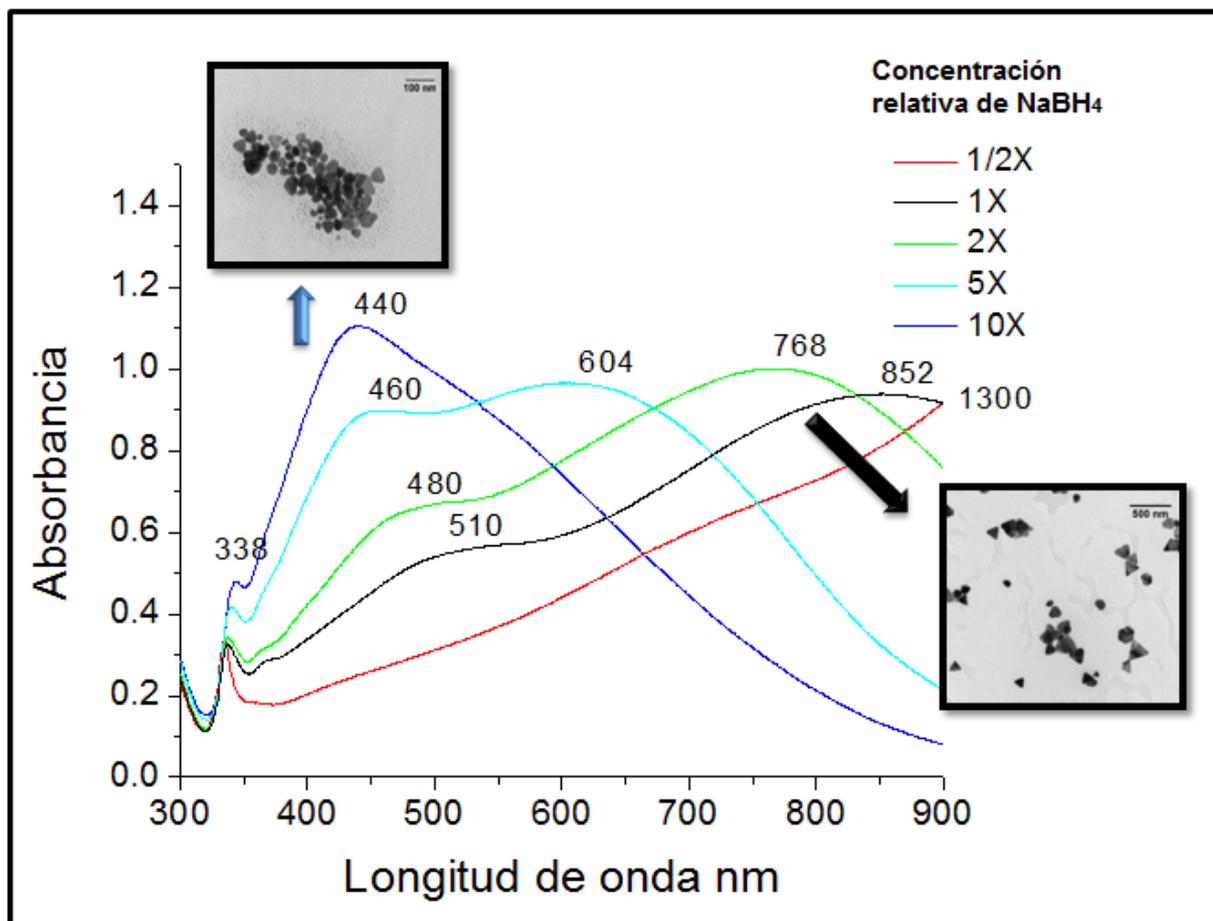


Figura 1: Espectros (entre 300 y 900nm) soluciones de nanopartículas, sintetizadas a partir de diferentes concentraciones de NaBH_4 siendo la original 1X, con el doble de NaBH_4 la verde (2X), el quintuple para la celeste (5X), decuple para la azul y la roja la mitad (1/2X). Se observa el corrimiento de los máximos a: 341 y 1300 nm (rojo), 338, 510, 852 nm (negro), 338, 480 768 nm (verde), 338, 460, 604 nm (celeste), 338, 440 nm (azul); producto de la predominancia de las nanopartículas triangulares para concentraciones de NaBH_4 en defecto y partículas esféricas para concentraciones de NaBH_4 en exceso. Adaptado de referencia ⁶³.

En resumen, la síntesis de nanopartículas esféricas se produce bajo control termodinámico, donde los agentes reductor y protector deben encontrarse en exceso respecto al precursor. Los agentes reductores fuertes favorecen la rápida reducción de la sal de la plata haciendo que se generen numerosos núcleos o semillas, las cuales crecen hasta llegar hasta cierto tamaño para el que se establece el equilibrio coloidal mediante la unión de las partículas con el agente estabilizante. Si este último se agrega al inicio de la síntesis, se reduce la etapa de crecimiento de las partículas obteniéndose nanopartículas de menor tamaño. En el caso contrario, si se desea obtener partículas grandes, es necesario prolongar la etapa de crecimiento para lo cual basta con agregar el agente a distintos tiempos desde el inicio de la

síntesis. En ambos casos el tamaño también dependerá del balance entre la naturaleza química del agente protector (especialmente de la afinidad química que tenga por la partícula) y de la concentración de agente reductor.^{63,90,96}

4.3 Destino de las nanopartículas de plata en ambientes reales

Una cuidadosa revisión a la literatura muestra que las nanopartículas de plata son susceptibles de transformaciones en los distintos medios en los cuales se encuentran^{16,22,97}. Esto es debido a su alta reactividad, consecuencia directa de la alta relación área/volumen que presenta la materia en la escala nanométrica.

De acuerdo con la teoría DLVO, las nanopartículas se encuentran rodeadas de una capa difusa electrostática, la cual define la carga promedio de la partícula que se relaciona directamente con sus propiedades en solución frente a los agentes externos como el pH, la fuerza iónica, y la naturaleza de los electrolitos²². El grado de reactividad de estos nanomateriales, dependerá a su vez de la naturaleza química del agente protector, el cual se encarga de contraponerse a los procesos que desestabilizan al coloide.

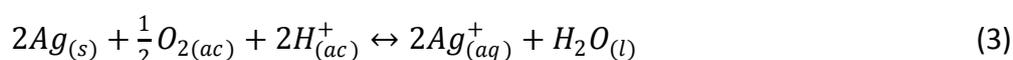
Si bien la teoría DLVO provee de las herramientas matemáticas y conceptuales para entender y predecir el destino de las nanopartículas en ciertas situaciones controladas, como toda teoría, es incompleta en cuanto a que no considera los mecanismos de protección estérica ni electroestérica, ni la existencia de otros agentes externos como la presencia de oxidantes y reductores (Tabla 1).

Tabla 1: Resumen de los principales factores que determinan el destino de las nanopartículas en ambientes reales. Adaptado de referencia ⁹⁷.

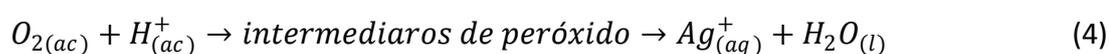
<i>Proceso</i>	<i>Factores intrínsecos</i>	<i>Factores extrínsecos</i>
Disolución	<ul style="list-style-type: none"> ○ Tamaño y forma ○ Agente de recubrimiento ○ Estado de agregación 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Composición de la solución : oxidantes, reductores
Agregación	<ul style="list-style-type: none"> ○ Agente de recubrimiento 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Composición de la solución: fuerza iónica
Reactividad Química	<ul style="list-style-type: none"> ○ Estado redox de los átomos de superficie ○ Relación área/volumen 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Composición de la solución : iones, ligandos, etc.

Influencia del oxígeno

En ausencia de otros agentes oxidantes la presencia de oxígeno disuelto es suficiente para generar una lenta oxidación superficial de las nanopartículas de plata de acuerdo con la siguiente ecuación:



La reacción es termodinámicamente favorable con un ΔG^0 de -91.3 kJ/mol a 298 K, siendo válida para un amplio rango de pHs y concentraciones de oxígeno disuelto en el rango entre 5 y 100% de saturación del gas ⁹⁸. Contrariamente a lo que se podría pensar, existen evidencias que sugieren que el mecanismo involucrado en el proceso de oxidación de plata (0) no sigue una transferencia directa de 4 electrones desde el oxígeno a la plata, para formar agua, sino que implica una serie de reacciones redox, que producen intermediarios de peróxido¹⁶:



De acuerdo con la ecuación, la oxidación de las partículas depende del pH. En medio ácido el exceso de protones favorece la reacción de oxidación, mientras que por el contrario, en medio alcalino se inhibe la reacción, al tiempo que se favorece la formación de la capa superficial de óxido.

Las nanopartículas sintetizadas en condiciones anaerobias presentan un tamaño considerablemente menor que las mismas sintetizadas en presencia de oxígeno, hecho que se atribuye a la redisolución de las partículas de menor tamaño, las cuales por presentar una mayor relación área/volumen son más susceptibles a la redisolución completa, generando que las nanopartículas pequeñas formadas en las primeras etapas del proceso de redisolución no puedan llegar a estabilizarse con el agente protector y por tanto se favorecen las de mayor tamaño⁹⁹. Este mecanismo es similar al mecanismo de formación de nanopartículas planas en presencia de peróxido de hidrógeno^{100,101}, donde el crecimiento de nanopartículas se genera por un mecanismo de reacciones opuestas entre la oxidación de las nanopartículas por medio del peróxido y la reducción del precursor por parte del borohidruro de sodio. En este caso el oxígeno, aunque con menor poder oxidante, actuaría de la misma forma que el peróxido compitiendo con el borohidruro determinando en definitiva la formación de partículas de mayor tamaño.

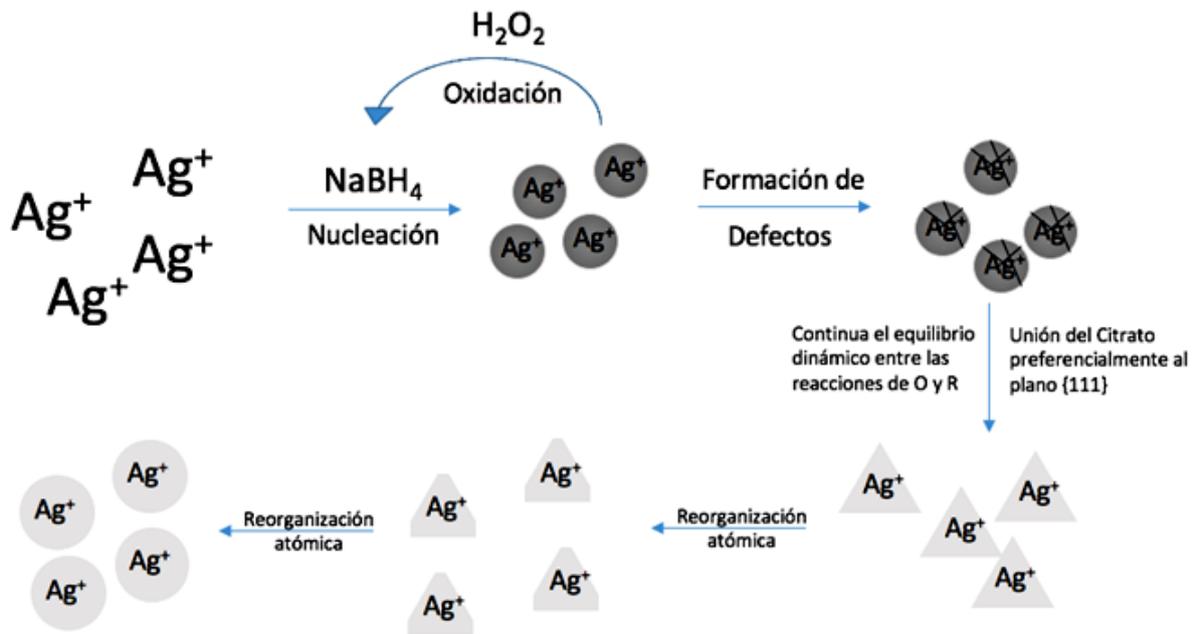


Figura 2: Esquema que ilustra el mecanismo de formación de nanotriángulos. Las nanopartículas triangulares se producen por un efecto de reacciones contrapuestas entre el peróxido y el borohidruro. Inicialmente se generan los primeros núcleos de nanopartículas de tamaño reducido, que conforme transcurre la reacción se redisuelven por la presencia de peróxido, determinando la selección natural de las nanopartículas de mayor tamaño, menos reactivas. Una vez consumido el peróxido, el remanente de borohidruro (que se encuentra en exceso) continúa el proceso de reducción generando la etapa de crecimiento de las partículas. Adaptado de referencia ¹⁰¹.

Desde el punto de vista de la cinética del proceso, la reacción de redisolución de la nanopartícula es de orden global 2:

$$v = k_{app} [Ag^0][O_2] \quad (5)$$

donde k_{app} es una constante cinética aparente que depende, además de la temperatura, del pH, la naturaleza y la concentración del agente protector y el tamaño de las partículas. A medida que se aumenta el pH la constante cinética aumenta logrando su máximo a 9.0. Por encima de este valor no se observan variaciones apreciables en las velocidades. Por su lado, el efecto del tipo agente de recubrimiento es más difícil de evaluar, debido a la multiplicidad de factores que operan sobre la eficiencia del agente protector. Sin embargo, existe una leve correlación inversa entre la concentración del agente empleado y la cantidad de iones Ag^+ liberados en la oxidación por oxígeno. Esta dependencia puede inhibirse sustancialmente frente a la presencia de cloruros, donde la constante cinética disminuye en

un factor de 1000 (Tabla 2). Este fenómeno podría explicarse por una pasivación de la superficie por la formación de cloruro de plata¹⁰².

Tabla 2: Efecto de la variación de la concentración de PVP, utilizado como agente de recubrimiento de las nanopartículas de plata, sobre la constante cinética del proceso de disolución con oxígeno. Se observa un apantallamiento de la oxidación a mayores concentraciones de PVP. En presencia de 0.05 mM de Cl⁻ se observa una inhibición del proceso de oxidación Adaptado de referencia ¹⁶

Concentración PVP /mM	Concentración Cl ⁻ / mM	Constante cinética aparente M ⁻¹ s ⁻¹
0.0	0	1.76
1.0	0	1.58
2.0	0	1.58
5.0	0	1.66
10.0	0	1.58
11.0	0	1.72
12.0	0	1.53
1.0	0.05	<10 ⁻³

Por su parte, el tamaño de las nanopartículas también afecta la capacidad de reaccionar con el oxígeno en solución. La razón principal generalmente se atribuye al aumento del área superficial efectiva, sin embargo también existen evidencias que muestran que la plata, en nanopartículas pequeñas, posee un potencial de oxidación de menor energía¹⁰³.

El efecto que tiene el oxígeno sobre las nanopartículas de plata permite explicar el funcionamiento de una de las aplicaciones más explotadas dentro del campo de la nanotecnología: la acción antibactericida de las nanopartículas de plata. Dentro de este contexto, si bien existen dos paradigmas acerca del posible mecanismo de acción, uno de ellos plantea que la plata (0) no presenta toxicidad por sí misma y por tanto las nanopartículas por sí solas son inofensivas para las bacterias. Sin embargo, la presencia de factores externos como el oxígeno, pueden generar la redisolución superficial de las

nanopartículas, liberándose en el proceso iones Ag^+ , de los cuales se conoce desde tiempos inmemoriales, su efecto bactericida de amplio espectro. Las nanopartículas simplemente actuarían como vehículos transportadores de iones, los cuales se liberarían de forma progresiva. Respecto a este punto, los estudios de Tesina de grado conducidos por Carissimi,¹⁰¹ en el Laboratorio de Biomateriales, mostraron que efectivamente el efecto bactericida depende de la presencia de iones plata presentes en disolución, lo cual deja en evidencia la alta reactividad de las nanopartículas frente a la presencia de diferentes factores ambientales.

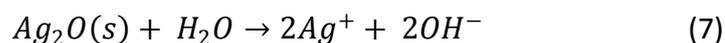
Naturaleza del agente de recubrimiento

Los componentes orgánicos presentes en ambientes reales también contribuyen a la estabilidad del coloide, variando en función de la afinidad relativa por la plata. Dependiendo de la naturaleza del agente, así como también de la concentración de los mismos, en muchos casos puede producirse adición o intercambios de ligandos que aumenten o disminuyan la estabilidad de las partículas variando su entorno fisicoquímico^{54,55,104}. Además, cada agente de recubrimiento posee distinta afinidad por las partículas, por lo que la fuerza protectora responderá al tipo de mecanismo de protección, ya sea electroestático, estérico, o electroestérico, o incluso puede involucrar la formación de un enlace covalente. Más aún, como se verá más adelante, en medios reales es posible que ocurran intercambios de ligandos, lo cual provoca que la estabilidad de las nanopartículas pueda variar dinámicamente con las condiciones del medio.

Disolución de nanopartículas de plata en presencia de cloruros

Como se mencionaba en apartados anteriores, las nanopartículas de plata son extremadamente sensibles a la presencia de oxidantes. Algunos autores postulan que durante el proceso de oxidación puede incluso formarse una capa superficial fina de Ag_2O ¹⁰⁵. En presencia de oxígeno, la presencia de iones Ag^+ evitan la redisolución de la partícula una vez formado el óxido tal y como se ilustra en las siguientes ecuaciones:





El agregado de iones Cl^- a la solución de nanopartículas genera la formación de cloruro de plata consumiendo los iones Ag^+ de la superficie de las partículas, desencadenando en consecuencia la reacción de disolución de las nanopartículas, lo cual puede observarse como una inmediata reducción en el tamaño de las partículas presentes, para luego generar la agregación de las partículas. Si bien este fenómeno era conocido, las evidencias presentadas hasta hace dos o tres años eran escasas y en algunos casos hasta confusas, dado que algunos trabajos planteaban que la presencia de nitrato de sodio era capaz de inducir el mismo efecto de redisolución y agregación de las nanopartículas, incluso de forma más pronunciada que para el caso del cloruro. Estos datos sugerían que los agregados se producían simplemente por cambios en la fuerza iónica que afectaban la protección del agente de recubrimiento siguiendo la teoría DLVO^{54,106,107}.

Para complicar aún más el panorama, otros estudios reportados en las nanopartículas recubiertas con PVP²² mostraron cómo, paradójicamente, bajas concentraciones de iones Cl^- incrementan la estabilidad de las nanopartículas (Tabla 2).

En capítulos posteriores se volverá sobre estos temas siendo una de las primeras etapas del proyecto de Tesis dar respuesta a la del mecanismo de agregación de partículas por la presencia de cloruros.

4.4 Aplicaciones de las nanopartículas de plata

En materia de aplicaciones nanotecnológicas, las nanopartículas de plata han sido objeto de estudio principalmente en las áreas analítica (con el desarrollo de sensores), la electrónica (con la fabricación de los circuitos impresos) así como también en el área microbiológica, explotando las propiedades antibactericidas que frente a una gran variedad de organismos (ejemplo, virus, bacteria, y hongos)^{108,109}. Dentro de estas tres grandes ramas de aplicaciones, la última es quizá la de mayor impacto y avance en los últimos tiempos, con la venta de productos comerciales que incluyen artículos de vestimenta contra el mal olor,

artículos médicos autoesterilizantes, productos cosméticos, lociones, cremas, detergentes, jabones, etc.⁸⁹

Dentro de las aplicaciones analíticas, el desarrollo de sensores colorimétricos y como potenciadores de las señales de espectroscopía infrarroja, Raman y SERS, son quizás las más destacadas^{110,111}.

En el campo de la electrónica, la aplicación más popular es la fabricación de circuitos impresos, donde las nanopartículas de plata se utilizan como tintas conductoras; aunque también se ha explorado el diseño de nanotransistores, capacitores y como potenciadores de las celdas fotovoltaicas^{112,114}.

Por fuera de estas líneas principales de investigación, las nanopartículas de plata han sido utilizadas como agentes catalíticos de reacciones químicas como la oxidación del monóxido de carbono¹¹⁵ y del benceno¹¹⁶, la fotodegradación del acetaldehído¹¹⁷, y la reducción del p-nitrofenol¹¹⁸.

Sin lugar a dudas las nanopartículas de plata presentan propiedades capaces de generar productos de innovación por lo que han estado en el foco de atención de las investigaciones científicas y aplicadas. En los capítulos subsiguientes se abordará la problemática del mercurio, su naturaleza química y los riesgos que presentan para la salud de la población; y cómo el uso de nanopartículas de metales como la plata pueden brindar una solución al problema no resuelto de contar con técnicas analíticas descentralizables, que permitan la detección temprana de mercurio en zonas contaminadas.

Capítulo V: Química del mercurio y sus riesgos para la salud

En la naturaleza el mercurio se presenta como un líquido estable monoatómico con propiedades químicas que en muchos casos lo asemejan a los gases nobles. Su tiempo de residencia en la atmósfera se estima que es del orden de un día o más siendo extremadamente tóxico para una amplia gama de organismos vivos, entre ellos el hombre, aún en muy bajas concentraciones. Cuando los vapores de mercurio pasan de la atmósfera a los ambientes acuíferos, los microorganismos presentes se encargan de metilarlo dando lugar a la formación de metilmercurio. Hoy día, la principal vía de exposición al mercurio es bajo la forma de metil mercurio, el cual a su vez se bioacumula en animales marinos¹¹⁹. Cuanto mayor es la vida del pez, mayor el tamaño que alcanza, y por lo tanto mayor es el tiempo que tiene para acumular el mercurio. De esta manera, los pescados más grandes (atún, pez espada) acumulan más mercurio que los pequeños¹²⁰. La naturaleza no polar del metilmercurio le permiten atravesar la barrera encefálica, pudiendo dañar selectivamente el cerebro. En adultos, afecta las células específicas de la corteza visual y del cerebelo. En niños la exposición puede ocasionar problemas de crecimiento tanto físico como mental¹²¹. Para complicar aún más el panorama, el metilmercurio tiene una vida biológica relativamente alta en humanos (44 - 80 días), con una excreción lenta que tiene lugar por las heces, la leche materna y la orina¹²², lo cual favorece el daño por acumulación del tóxico.

El mercurio que es ingerido o inhalado bajo la forma de Hg^0 en el organismo se une al glutatión (GSH) y/o a la cisteína (Cys) formando complejos tiolados. Dado que la concentración de GSH intracelular es relativamente alta (del orden de los 1-10 nM), es esperable que se formen los complejos de Hg-glutatión que pueden desestabilizar el aparato bioquímico. En el organismo, los órganos que más sufren la presencia del metal son el sistema nervioso y los riñones. En el caso de las embarazadas afectan fundamentalmente el desarrollo del feto. En segundo plano también puede afectar el sistema respiratorio, cardiovascular, gastrointestinal, hematológico, inmune y reproductivo¹²².

5.1 Aspectos regulatorios del mercurio

El mercurio es un metal que puede encontrarse presente en varios productos del hogar (termómetros, baterías, productos dentales, etc.), lo cual agrava el problema de la contaminación de este metal. La población se encuentra expuesta por múltiples vías desde su inhalación ambiental, por el consumo de alimentos (fundamentalmente marinos), el agua contaminada, el suelo, implantes dentales, entre otros¹²².

Si bien en muchos países se ha iniciado el recorrido de tratar de eliminar el mercurio de los productos cotidianos, Uruguay se encuentra aún muy retrasado en este aspecto, aunque existen material de advertencia por parte de las autoridades competentes, a la fecha no existe una regulación específica que prohíba el uso del mercurio en el hogar. El paso más concreto respecto a esto se realizó recién en el 2013, con la firma del Convenio de Minamata, donde Uruguay se compromete a eliminar las fuentes de mercurio para el año 2020¹²³. En el marco de este tratado los gobiernos han acordado varias medidas, entre las cuales se destaca la prohibición de la producción, importación y exportación de una variedad de productos que contienen mercurio^{124,125}.

A nivel de políticas públicas, se aconseja no eliminar el consumo de pescados grandes, sino limitar su consumo. Es, por lo tanto, responsabilidad de la población consumir este tipo de pescados con una frecuencia no mayor de 15 días, y es responsabilidad de las autoridades, educar a la población y darle a conocer los riesgos a los que se encuentran sometidos si consumen estos pescados con una frecuencia mayor¹²⁶.

5.2 Aspectos químicos

Comparado a otros metales del bloque *d* de la tabla periódica, el mercurio es un metal muy singular dado que presenta ciertas propiedades características, como ser una baja conductividad térmica, excelente conductividad eléctrica, bajo punto de fusión y ebullición, que se explican por su configuración electrónica particular. La configuración electrónica del ión Hg^{2+} es $[\text{Xe}] 5d^{10} 6s^0$, con todos los orbitales atómicos desde el 1s al 6s se encuentran completamente llenos. En general se acepta que la ausencia de estados de oxidación mayores a 2 indican que los electrones *d* no participan en los enlaces con ligandos¹²⁷.

En este sentido existen varias características químicas importantes a la hora de comprender las estrategias analíticas utilizadas para el diseño de sensores del metal, y para entender su reactividad con los medios biológicos. En particular se destaca la interacción con ligandos donores como son las interacciones específicas 1:2 de los complejos mercurio-timina, así como también la capacidad que presenta el Hg^0 de formar amalgamas con otros metales, como el oro o la plata⁸³.

5.3 Química del mercurio en solución acuosa

En solución acuosa, el mercurio (II) se encuentra coordinado a 6 moléculas de agua, formando una estructura octaédrica distorsionada^{128,129}. Esta estructura junto con la tendencia del mercurio de formar estructuras de tipo co-linear es atribuida a los efectos relativista que resultan de una diferencia de energía entre los orbitales 6s y los 6p que limita la formación de los orbitales sp ¹³⁰. De acuerdo con la clasificación de Pearson, el mercurio (II) es un ion blando debido a su gran tamaño y polarizabilidad y como consecuencia presenta afinidad por especies donoras como el azufre, el selenio, el fosforo¹³¹ y por los haluros I^- , Br^- and Cl^- (Tabla 2).

Tabla 2: Constantes de equilibrio de formación de los distintos complejos de mercurio (II) con ligandos inorgánicos, a 298 K y fuerza iónica nula. Adaptado de referencia ^{132,133}

Ligando	Reacción	log β°
Cloruro	$\text{Hg}^{2+} + \text{Cl}^- = \text{Hg}(\text{Cl})^+$	7.3
	$\text{Hg}^{2+} + 2 \text{Cl}^- = \text{Hg}(\text{Cl})_2$	14.0
Carbonato	$\text{Hg}^{2+} + \text{CO}_3^{2-} = \text{Hg}(\text{CO}_3)$	10.6 (0.5) 11.8*
Hidróxido	$\text{Hg}^{2+} + \text{OH}^- = \text{Hg}(\text{OH})^+$	10.6
	$\text{Hg}^{2+} + 2 \text{OH}^- = \text{Hg}(\text{OH})_2$	21.8
Sulfato	$\text{Hg}^{2+} + \text{SO}_4^{2-} = \text{Hg}(\text{SO}_4)$	1.3 (0.5) 2.6*
Bromuro	$\text{Hg}^{2+} + \text{Br}^- = \text{Hg}(\text{Br})^+$	9.1 (0.5) 9.7*
	$\text{Hg}^{2+} + 2 \text{Br}^- = \text{Hg}(\text{Br})_2$	17.3 (0.5) 18.1*
Fluoruro	$\text{Hg}^{2+} + \text{F}^- = \text{Hg}(\text{F})^+$	1.0 (0.5) 1.6*
Amonio	$\text{Hg}^{2+} + \text{NH}_3 = \text{Hg}(\text{NH}_3)^{2+}$	8.8(22,2.0)
	$\text{Hg}^{2+} + 2 \text{NH}_3 = \text{Hg}(\text{NH}_3)_2^{2+}$	17.4(22,2.0)
Sulfuro	$\text{Hg}^{2+} + 2 \text{HS}^- = \text{Hg}(\text{HS})_2$	37.7(20,1.0)
Fosfato	$\text{Hg}^{2+} + \text{PO}_4^{3-} = \text{Hg}(\text{PO}_4)^-$	9.5 (3.0) 12.1*

* Valores corregidos para fuerza iónica nula

Los ligandos donores O- son considerados duros, mientras que los donores N muestran características intermedias entre los blandos y los duros. Es por este motivo que se puede predecir la preferencia del mercurio en la formación de complejos con ligandos donores S > N > O. Las energías de Gibbs de unión entre ejemplos de ligandos pertenecientes a los diferentes grupos apoyan esta tendencia, estableciendo que la formación de complejos de mercurio claramente siguen un mecanismo de control termodinámico mixto¹³⁴. En todos los casos la formación de complejos es favorable, generando procesos exotérmicos y con aumento de la entropía. Sorprendentemente, la contribución entrópica de los N y O donores es del mismo orden de magnitud lo cual supone que la preferencia termodinámica por en la formación de uno u otro tipo de ligando depende de la componente entálpica de cada proceso.

Formación de Amalgamas

Desde la antigüedad se conoce la capacidad que tiene el mercurio de formar amalgamas de forma específica con metales como el oro y la plata, fenómeno que era utilizado en las minas para la extracción de estos metales valiosos.

Para el caso de las nanopartículas de oro el proceso de formación de amalgamas involucra la adsorción sobre el metal y luego la difusión hacia el interior de la partícula pudiendo alcanzar una penetración máxima de ca. 3 nm¹³⁵. En otras palabras, la interacción entre una solución coloidal de nanopartículas de 11 nm y el Hg (0) genera que al final del proceso alrededor del 15% del tamaño de la partícula corresponda a los átomos amalgamados de mercurio (0)¹³⁵.

Para el caso de las nanopartículas de plata (de tamaño < 32nm), la reacción de formación de la amalgama tiene lugar en una relación atómica Hg:Ag de 1.125:1, sobre la superficie de la partícula¹³⁶. Este dato contrasta con la relación Hg:Ag de 1:2 observada para la formación de amalgama en el metal macroscópico.

Cálculos teóricos revelaron que la unión entre el mercurio y el oro se genera a partir de la transferencia de electrones entre el orbital s de Hg y el orbital s del Au^{137,138}. De la misma forma en la interacción con la plata participan los electrones en los orbitales s de ambos metales, junto los electrones de los orbitales p del mercurio con el orbital s de la plata¹³⁸.

5.4 Extracción y almacenamiento de las muestras de mercurio

La dificultad en la recolección de las muestras para el análisis de mercurio se encuentra bien documentada, especialmente en soluciones acuosas de trazas de mercurio, donde puede existir pérdidas debido a la volatización y/o absorción del analito por las paredes del recipiente contenedor. Los materiales como el cuarzo, vidrio Pírex, Teflón® plásticos de politetrafluoroetileno o tereftalato de polietileno son los más adecuados para minimizar pérdidas en los recipientes contenedor¹³⁹. Sin embargo si se trabaja con concentraciones estándar de mercurio por debajo de los 0.05 nM, se debe trabajar con muestras frescas. En general las muestras almacenadas de mercurio son solamente estables por un máximo de 5

semanas, a diferencia de otros metales pesados los cuales pueden ser almacenados por hasta 6 meses o más. Junto con el almacenamiento apropiado, normalmente se utilizan soluciones de HNO₃ para minimizar la formación de los óxidos del metal. Este inconveniente refuerza la necesidad real de lograr diseñar métodos de detección de campo¹⁴⁰.

Pre tratamiento de las muestras

Los protocolos de pre tratamiento de muestras normalmente utilizan ácidos y oxidantes fuertes como el HNO₃, H₂SO₄, K₂S₂O₈, KMnO₄, K₂CrO₇, HCl, H₂O₂ y BrCl. Todas estas sustancias deben ser analizadas y certificadas para el análisis de mercurio. En otros casos para la extracción en muestras más complejas como el casos de muestras de cabello, se utilizan solventes orgánicos como el hexano, alcohol, acetona, agua, dietiléter y detergentes para remover el polvo y la grasa¹⁴¹.

En sedimentos sólidos el mercurio puede ser extraído y/o analizado de forma *in situ*. El método EPA 7473 provee de una guía práctica para detectar la cantidad total del analito sin la necesidad de tratamientos de extracción previas. En otro orden análisis de especiación del mercurio requieren de métodos de extracción complejos que incluyen el uso de microondas y ultrasonido seguido de separación de cada una de las especies mediante solvente orgánico y columnas de separación en fase sólida.

En los casos donde solamente alcanza con conocer la concentración total de mercurio, una digestión simple del mercurio es suficiente, utilizando oxidantes químicos o por métodos de calentamiento a altas temperaturas (pirólisis/combustión). La oxidación química requiere el uso ácidos concentrados y agentes oxidantes¹³⁹. Para muestras sólidas se recomienda el uso de de ácido fluorhídrico para remover el metal de las matrices orgánicas.

Otro aspecto clave que debe ser tenido en cuenta durante las digestiones es evitar la volatilización del mercurio, para lo cual es necesario controlar adecuadamente las temperaturas de digestión (generalmente entre 60-70°C), o bien trabajando en todo momento en recipientes cerrados si se requiere aumentar la temperatura a 90 – 100 °C^{139,141}.

Por su parte los métodos la combustión y pirólisis involucran el uso de oxidantes y reductores, y normalmente tienen una etapa de reconcentración con trampas de mercurio

(generalmente una lámina de oro) las cuales selectivamente capturan el analito, evitándose de esta forma las interferencias químicas¹³⁹.

Por fuera de las recomendaciones del EPA, existen métodos innovadores¹⁴² que utilizan energía de microondas (a 630 W) y altas presiones para la extracción de mercurio de pescados, permitiendo evitar el uso de ácidos y oxidantes fuertes.

Métodos de preconcentración de las muestras de mercurio

Existen básicamente dos métodos de preconcentración de mercurio: por un lado las trampas de mercurio utilizadas en el análisis por absorción atómica de vapor frío¹⁴³ y por otro lado los métodos químicos que explotan la alta afinidad de las formas del mercurio, en particular el mercurio (II) por el grupo tiol¹⁴⁴.

El primero consiste en concentrar el mercurio utilizando una lámina activada de oro, la cual atrapa al metal en solución por formación de amalgama, y se recupera finalmente calentando el oro a la temperatura de ebullición. El ciclo de amalgamamiento y generación de vapor de mercurio puede repetirse varias veces hasta alcanzar la concentración deseada.

Dentro de los métodos químicos, se utilizan los llamados tiol-SAMMS (*Tiol Self Assembled Monolayers on Mesoporous Silica*). Estos sustratos sólidos y porosos permiten atrapar los iones de mercurio (II) con una alta afinidad, especificidad y velocidad de absorción en un amplio rango de pH (4-12)¹⁴⁵. Estos sistemas se utilizan no solo para la preconcentración de muestra, sino también como métodos de descontaminación, para la remoción del metal en efluentes, dado que la sílica porosa que actúa de soporte, permite la incorporación de múltiples moléculas de tioles¹⁴⁵⁻¹⁴⁶. Los tiol-SAMMS pueden absorber grandes cantidades de mercurio de forma rápida alcanzándose porcentajes de remoción de ca. 98.9%¹⁴⁷.

Como alternativa, se ha empleado el uso de ionóforos formados por copolímeros con una prevalencia de grupos tioles y sulfónicos que exhiben una estructura macroporosa capaz de capturar al mercurio (II). Estas macromoléculas se emplean en resinas de intercambio, permitiendo la concentración de mercurio. A modo de ejemplo se encuentra el

mercaptoestirenedivinil benceno, el cual se deposita en electrodos de trabajo de platino, para la detección selectiva del mercurio por impedancia ¹⁴⁸.

Capítulo VI: Sensores de mercurio basados en el uso de nanopartículas

Históricamente las técnicas analíticas para la determinación del mercurio total en aguas a concentraciones trazas se basaban en el uso de un equipamiento pesado y costoso, como la técnica de absorción atómica de vapor frío, emisión atómica de plasma o la espectrometría de fluorescencia atómica ¹⁴¹. Con el devenir de los años el equipamiento se ha reducido sustancialmente ayudando al proceso de descentralización. Sin embargo, a partir de la concientización de la población sobre los peligros del metal, conjuntamente con las políticas de protección medioambientales, en los últimos años creció la demanda del monitoreo del mercurio en campo, lo cual motivó en abrir la búsqueda de nuevas tecnologías simplificadas ¹⁴³, donde las nanopartículas aparecen como los candidatos justos para la generación de sensores descentralizados, tales que permitan el análisis rápido, a un menor costo y que eviten los problemas de transporte y conservación de las muestras.

Debido a los altos valores en los coeficientes de extinción molar y al amplio rango de valores para los cuales se cumple la aditividad de la absorbancia con la concentración (Figura 1), las nanopartículas de oro y plata han sido utilizadas para el diseño y desarrollo de sensores colorimétricos ^{59,149,150}.

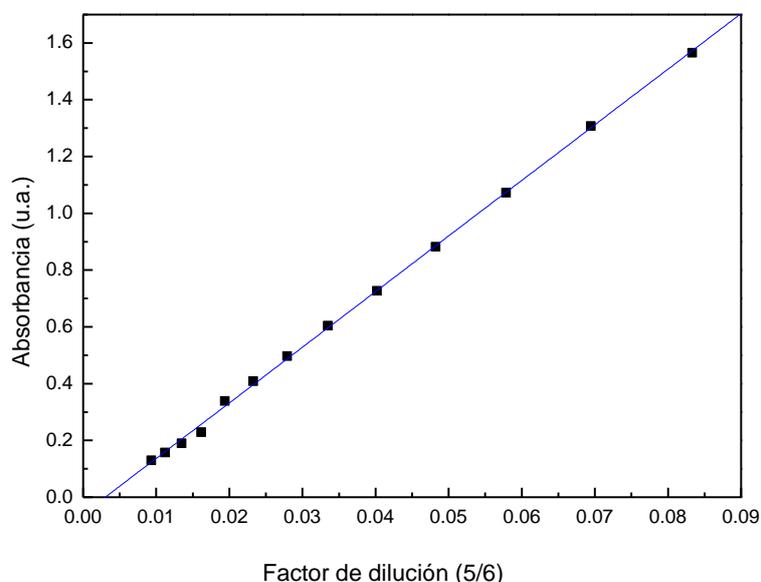


Figura 1: Diluciones seriadas de nanopartículas recubiertas de almidón mostrando el amplio rango de linealidad entre la concentración y la absorbancia.

A grandes rasgos existen cuatro estrategias generales de trabajo (Figura 2). Por un lado se encuentran los sensores colorimétricos basados en la interacción directa de las nanopartículas con el núcleo metálico generalmente utilizando la formación de amalgamas. En una segunda clasificación se encuentran los sensores que utilizan moléculas conectoras específicas de reconocimiento del mercurio. En tercer lugar están las técnicas de inmovilización de nanopartículas, fundamentalmente empleadas en la búsqueda de desarrollar bandas colorimétricas similares a los *kit* de detección de pH. Finalmente se encuentran las técnicas complementarias las cuales utilizan otros métodos no colorimétricos de detección para mejorar la señal de respuesta. Dentro de estas últimas se destacan las técnicas electroquímicas. A continuación se describen las estrategias empleadas, junto con las ventajas y desventajas de cada una de ellas.

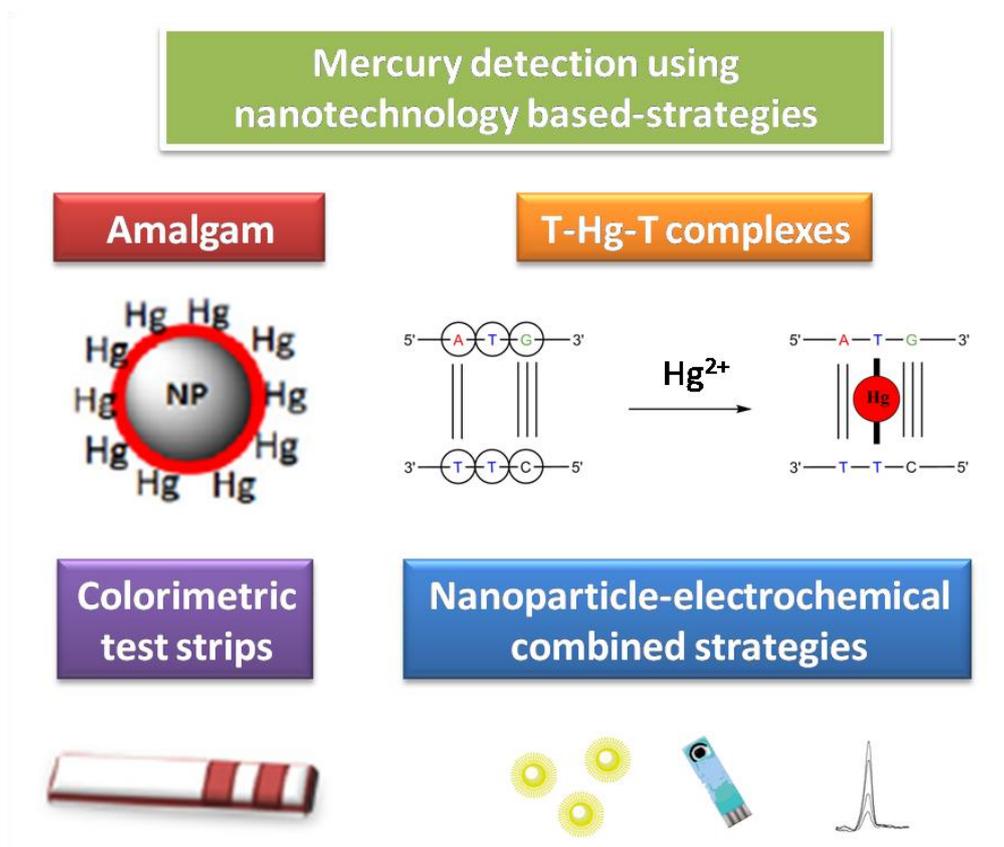


Figura 2: Esquema de las principales líneas de investigación en materia de desarrollo de dispositivos portátiles, para la detección de mercurio. Adaptado de referencia ⁵⁹.

6.1 Sensores basados en a amalgama y formación de complejos entre la plata y/o el oro con el mercurio

Dentro de esta categoría se ubican las estrategias de censado más simples, aunque paradójicamente menos exploradas. Se basan en la detección directa del mercurio basándose en la interacción fuerte y específica que existe en la formación de la amalgama mercurio-plata o mercurio-oro. La técnica se inspira en los antiguos métodos de extracción del oro en las minerías¹⁵¹ donde la gran afinidad del mercurio por formar amalgamas preferentemente con el oro o la plata era útil para purificar los metales valiosos del resto.

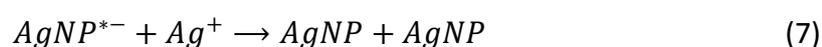
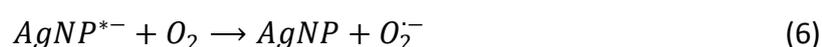
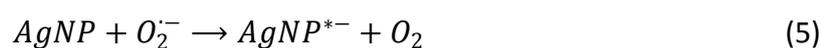
Como se describía en apartados anteriores, las nanopartículas de plata presentan una fuerte reactividad ante las condiciones externas. Más aún cualquier cambio en el entorno fisicoquímico de las mismas produce cambios en la resonancia superficial del plasmón (RSP) y por tanto puede ser fácilmente detectado por espectroscopía UV-Vis o simplemente por inspección visual.

La formación de la amalgama de mercurio es una reacción espontánea que se traduce en un corrimiento en la resonancia hacia longitudes de onda de mayor energía concomitantemente con una disminución en la intensidad de la señal^{59,152}. Debido a que los potenciales redox de las nanopartículas de plata y de mercurio se encuentran muy cercanos entre sí, se facilita la transferencia de electrones de un metal a otro sin la necesidad de vencer grandes barreras de energía potencial. Como consecuencia de esto, las técnicas son capaces de detectar mercurio (0), mercurio (I) y mercurio (II) sin la necesidad del agregado de agentes reductores externos.



Más aún, para el caso de las nanopartículas, la reacción de amalgama se potencia debido a que los valores de los potenciales redox disminuyen como consecuencia de la escala.

Entre las variaciones que se encuentran reportadas para esta estrategia, está el uso de agentes reductores y oxidantes, utilizados para facilitar la formación de la amalgama y por tanto mejorar la sensibilidad de la respuesta colorimétrica. Entre estos está el uso de peróxido de hidrógeno¹⁵³ el cual es utilizado para rápidamente iniciar una redisolución superficial de la plata, dando lugar a la formación de radicales superóxidos e iones Ag (I) (Reacciones 5-7). El superóxido participa en la formación de nanopartículas electrónicamente cargadas (AgNPs^{*-}) las cuales actúan como agentes reductores del mercurio.



Otras variantes, también enfocadas en potenciar la sensibilidad del método y así generar sensores que puedan ser utilizados a simple vista, se encuentra en el uso de nano bastones y nano discos, los cuales se caracterizan por presentar modos dipolares de resonancia que son más sensibles a los entornos fisicoquímicos que los modos cuadrupolares responsables de la absorción de luz de las esferas. De esta manera, la presencia de mercurio produce cambios espectrales más pronunciados.

La respuesta colorimétrica de este tipo de sensores es altamente específica para el mercurio, frente a una gran variedad de cationes como el Pb²⁺, Cd²⁺, Zn²⁺, Ca²⁺, Cu⁺, Mn²⁺, Ce³⁺, Al³⁺, K⁺, Na⁺, Co²⁺, Ag⁺, Ni²⁺ y Mg²⁺. Sin embargo, pese a la ventaja que presenta respecto a la sensibilidad, selectividad y sencillez, la gran mayoría de los trabajos publicados no le brindan la importancia que merece a la presencia de aniones en solución, en particular los iones cloruros, que juegan un rol principal en los estudios de estabilidad de los coloides.

Sensores basados en el uso de ligandos de reconocimiento del mercurio (II)

El uso de ligandos específicos y de alta afinidad por el mercurio es otra interesante alternativa en las estrategias de ensayo colorimétricas. De los valores altos de las entalpías para el enlace entre el mercurio y las timinas, sumado a la ventaja del apareamiento específico que presenta el ADN, surgen los populares sensores basados en la estrategia de

Mirkin¹⁴⁴ que explotan las formaciones de los puentes T-Hg²⁺-T, cuya alta afinidad química logra alcanzar energías de unión de 24.53 Kcal mol⁻¹ ($K_{unión} \sim 1 \times 10^{18} \text{ M}^{-1}$ a 298 K)¹⁵⁴. El mecanismo de formación de los puentes T-Hg^{II}-T consta de una etapa de deshidratación de los iones de Hg(II) y una segunda etapa de sustitución de los electrones del grupo NH de la posición 3 de las moléculas de timina. Comparado con otros cationes divalentes, el mercurio posee un tamaño que se ajusta perfectamente a la cadena de ADN sin alterar demasiado su estructura helicoidal¹⁵⁵. Además existe evidencia experimental y teórica, que muestran que el enlace T-Hg^{II}-T a través de los grupos NH de las timinas tiene una geometría lineal, lo facilita el emparejamiento de las restantes bases nucleotídicas¹⁵⁶.

Ejemplos de estos últimos son los sensores de nanopartículas de oro recubiertos con 2,5 dimercapto 1,3,4 - tiodiazol^{157,158}. En presencia de mercurio los complejos de geometría octaédrica, deformados entre el grupo tiol y el mercurio, disminuyen la distancia interpartícula, lo cual se traduce en modificaciones en el RSP (Figura 3).

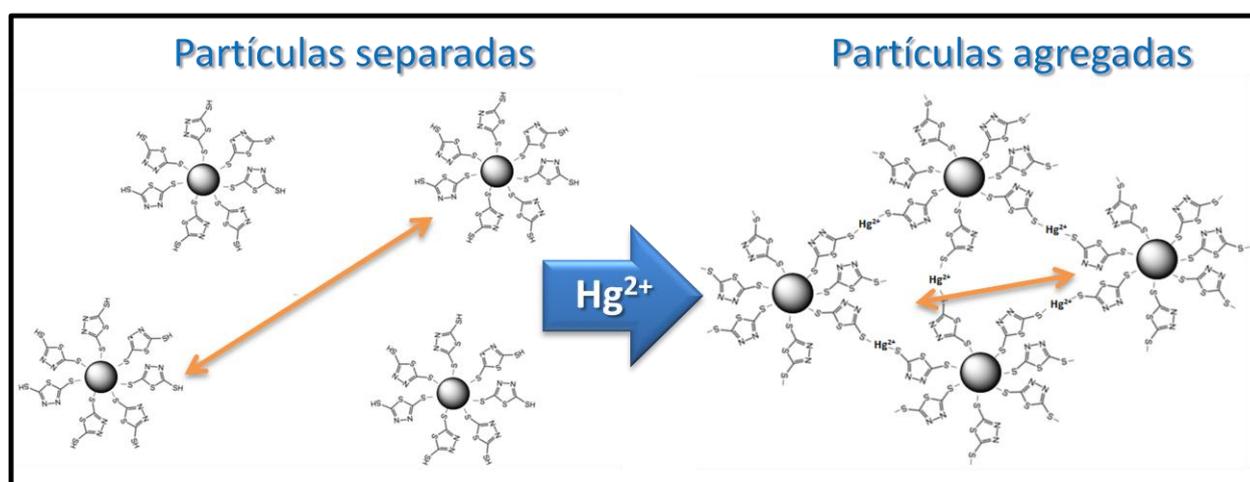


Figura 3: Esquema del sensor de mercurio basados en el uso de ditioles como el caso de la 2,5 dimercapto 1,3,4 - tiodiazol. En presencia de mercurio, se forma un complejo de geometría octaédrica deformada, entre el metal y el compuesto orgánico dando lugar a una disminución de la distancia interpartícula, la cual puede ser detectada por cambios en el plasmón.

Para mejorar aún más la respuesta, algunas variantes presentan el uso de equipos de fluorescencia que intensifican la señal, debido a que la formación de agregados entre las partículas confieren restricciones conformacionales capaces de ser detectadas por fluorescencia. Variantes de estas técnicas permiten llegar a límites de detección en el rango femtomolar utilizando luminiscencia y moléculas protectoras sensibles como el 3,5 diamino-

1,2,4-triazol, que en presencia de de iones de mercurio pueden formar cadenas de agregados inducidas por la formación de complejos con el metal.

Siguiendo con este tipo de estrategias, surgen los trabajos que presentan sensores de mercurio utilizando ADN, los cuales remplazan a la a los compuestos químicos orgánicos tiolados. La razón de esta tendencia es simplemente la facilidad con la cual pueden sintetizarse moléculas de ADN, pudiendo definir el largo de la cadena molecular, el grado de complementariedad de bases y la cantidad de timinas, las cuales atrapan al mercurio. De esta forma la literatura muestran numerosos trabajos en dónde se experimenta con distintas variantes de DNA.

Un ejemplo de este tipo de estrategia son los sensores basados en la agregación de nanopartículas en presencia de mercurio, desencadenado por la unión de dos nanopartículas en donde cada una se encuentra recubierta con hebras de DNA complementarias entre sí, excepto por algunas timinas permitiendo la agregación solamente en presencia de mercurio (Figura 4) ^{59,150}.

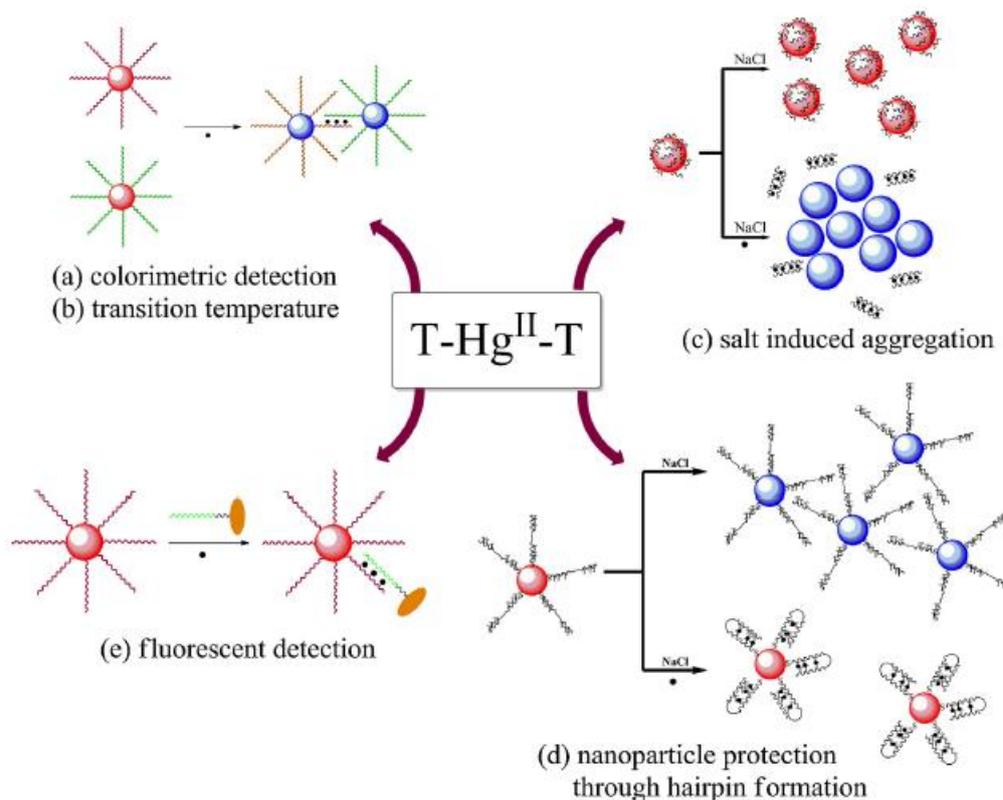


Figura 4: Ejemplos de estrategias de sensado de de nanopartúclas basado en la formación de los puentes T-Hg^{II}-T. Adaptado de referencia ⁵⁹.

Exceptuando algunos pocos trabajos dónde se conjugan moléculas de DNA con ligandos fluorescentes para amplificar la señal, la gran mayoría de los sensores basados en ADN son simplemente de tipo colorimétricos. Sin embargo, se han empleado varias estrategias para potenciar la sensibilidad de la respuesta. Uno de los primeros trabajos al respecto fue promovido nuevamente por el grupo de Mirkin¹⁴⁴ quienes propusieron la posibilidad de medir los cambios en la temperatura de transición (T_m) del ADNds en lugar de solamente enfocarse en los cambios colorimétricos. La dependencia lineal entre la T_m y la concentración de mercurio (II) produce incrementos en el T_m del ADNds del orden de los ca. 5°C. Esto permite límites de detección del orden de los 100 nM de mercurio con una selectividad destacable.

Otros autores explotan el hecho que las hebras simples de ADNss no son tan buenas como agentes protectores de las nanopartículas que las doble hebra de ADNds. El diseño de este tipo de sensores involucra nuevamente el uso de dos hebras simples complementarias exceptuando por algunas timinas que impiden la hibridización. En este caso el ADN protege la agregación de la partículas a través de uniones débiles, por lo que la ventaja de estos sensores es que no requieren de ADN tiolados, lo cual disminuye el costo y simplifica el diseño. En ausencia de mercurio (II) las hebras de ADN permanecen separadas, incluso luego del agregado de pequeñas cantidades de sales, las cuales se utilizan para remarcar la diferencia. Por el contrario si el mercurio (II) está presente, el ADN se hibridiza y las dobles hebras resultantes no pueden evitar la agregación de las partículas (Figura 4). Utilizando un concepto similar, pero remplazando las nanopartículas de oro y plata por magnéticas, se mejora los límites de detección, midiendo la relajación magnética en lugar de la respuesta colorimétrica¹⁵⁹.

El largo en las cadenas de ADN así como también el número de bases de timina son los principales factores que definen la performance de los sensores. Se ha estudiado que las cadenas largas de ADN complementarias excepto por un alto número de bases de timina, amplían el rango de respuesta lineal del sensor, sacrificando parte de la sensibilidad¹⁶⁰. Esto es debido a que se necesita una mayor cantidad de mercurio (II) para formar los puentes T-Hg^{II}-T necesarios para hibridar las cadenas. Por el contrario una menor cantidad de Timinas, necesita menos mercurio (II) para unir las cadenas y por tanto aumenta la sensibilidad, al

costo de acortar el rango lineal de concentraciones detectables de mercurio, dado que una pequeña cantidad de mercurio ya es suficiente para hibridizar las hebras.

Otra clase de sensores más sofisticados, combinan el uso de ADN tiolados conjugados a nanopartículas junto con métodos de separación por centrifuga de manera de disminuir el límite de detección. Es el caso de los sensores que utilizan la 5'-tiol-politimina, la cual se usa para secuestrar a los mercurios y las nanopartículas de plata, para aumentar la masa de las hebras de ADN las cuales se separan por centrifugación. Luego se agrega peróxido de hidrógeno en exceso para oxidar a las nanopartículas de plata y así dejar libre al mercurio, el cual se detecta utilizando una sonda complementaria de ADN conjugadas a una molécula fluorescente. Esta estrategia de centrifugado, permite concentrar al mercurio por lo cual la sensibilidad se aumenta tantas veces como se quiera. Como contrapartida los tiempos de duración del análisis pueden ser largos ¹⁶¹. Otra alternativa surge del uso de nanopartículas conjugadas con moléculas apolares, con tioles capaces de capturar al mercurio, pero teniendo mayor afinidad por la fase orgánica. Mediante extracciones puede separarse y concentrarse el mercurio, para su posterior detección. A igual que el anterior presentan la desventaja de ser procesos complejos, lentos y requieren de grandes cantidades de muestra para concentrar (Figura 5).

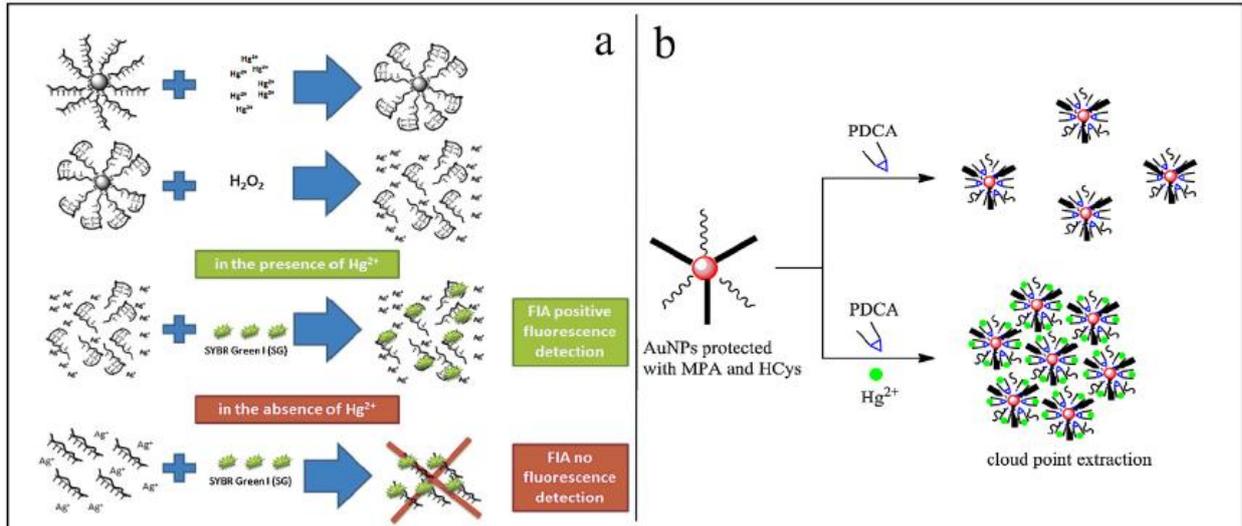


Figura 5: Sensores basados en la preconcentración del mercurio (II). Las moléculas de politiminas de ADN conjugadas a nanopartículas se utilizan para capturar las moléculas de mercurio en solución, para luego ser separadas por centrifugación, liberándose el mercurio tras el agregado de peróxido de hidrógeno. La detección final se realiza por FIA utilizando una sonda fluorescente conjugada a una hebra complementaria de ADN (a). Otra alternativa de preconcentración se encuentra en el uso de nanopartículas doblemente conjugadas, por un lado con moléculas de reconocimiento selectivo y de alta afinidad por el Hg y por el otro con moléculas apolares, que le confieren una alta afinidad por una fase orgánica la cual se utiliza para la extracción, concentrando de esta forma el mercurio presente en la muestra (b). Adaptado de referencia ⁵⁹.

Otro ejemplo de tecnología híbrida es el uso de fibras de microextracción para concentrar el mercurio, conjuntamente con nanopartículas de oro y un potenciostato como método de detección. En este sistema los iones de mercurio (II) son capturados por una membrana porosa de polipropileno constituida por 1-(2-piridilazo)-2-naftol (PAN). Dentro de la fibra se encuentra una solución quelante de EDT, nitrato de potasio y ácido sulfúrico. La detección se completa mediante un electrodo de platino dopado de nanopartículas de oro, al cual se amalgama con el mercurio concentrado y la señal es detectada mediante voltamperometría de *stripping* anódico. Tanto las nanopartículas de oro como la solución orgánica embebida en la membrana porosa se encargan de preconcentrar la muestra, aumentando la sensibilidad de la técnica (Figura 6).

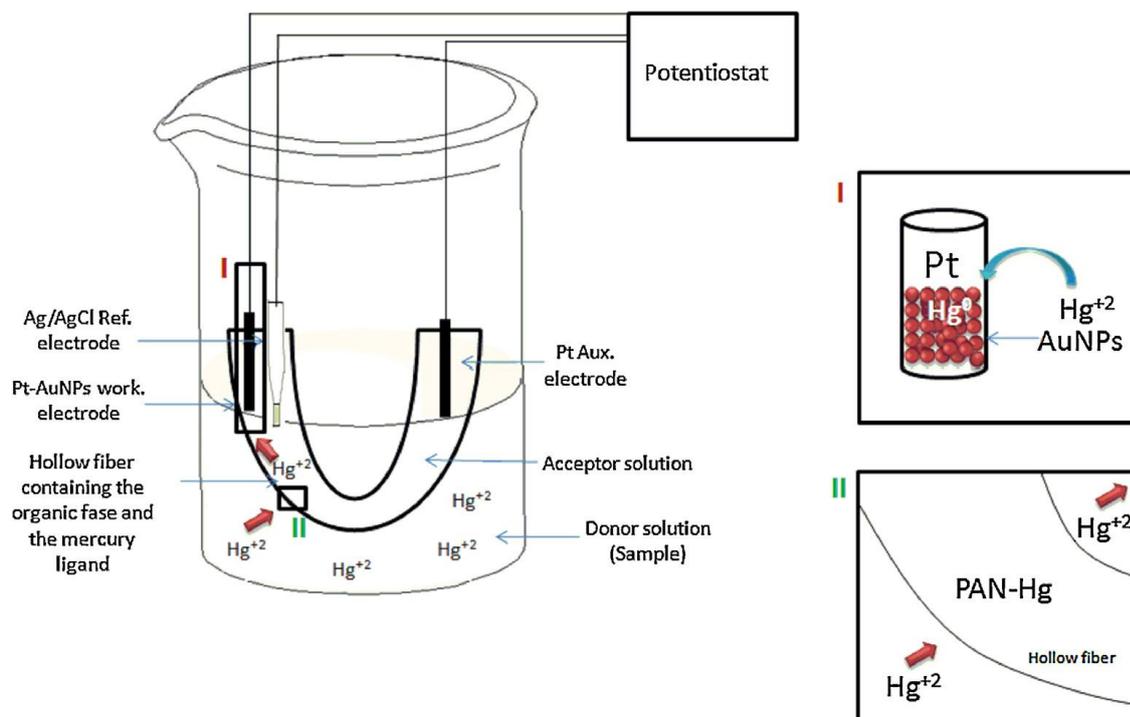


Figura 6: Ejemplo de tecnologías combinadas de preconcentración con fibras embebidas de sustancias capaces de captar el mercurio conjuntamente con electrodos recubiertos de nanopartículas de oro, que tienen la capacidad de amalgamar al mercurio. La detección se realiza por métodos electroquímicos, aumentando el poder de detección. Adaptado de referencia ⁵⁹.

En todos los casos descritos anteriormente las estrategias apuntan a resolver el problema utilizando sistemas de detección en solución acuosa, lo cual tiene su desventaja a la hora de la comercialización de las técnicas. El siguiente apartado trata algunos ejemplos de estrategias en donde la principal motivación es conseguir sensores inmobilizados, particularmente apuntando al desarrollo de test de detección primarios, similares a las tiras de pH.

En la búsqueda de un *kit* colorimétrico de mercurio

Los sistemas de inmovilización poseen varias ventajas sobre los sensores que trabajan en solución: evitan fenómenos de agregación no deseados, reducen el pre-tratamiento de las muestras, son de rápida respuesta y en general no requieren de instrumentos sofisticados

Duan y Guo ^{162,163} diseñaron un sensor inmovilizado en tiras de papel consistente en una primera banda dopada con nanopartículas de oro conjugadas a una molécula de ADN1 anclada en el extremo 3' a una molécula de botina y en el otro extremo 5' a un grupo tiol. La segunda banda contiene las hebras de ADN 2 cuyas secuencias de bases es complementaria a la primera. La tercera banda se compone de moléculas de estreptavidina, las cuales tienen la capacidad de capturar de forma específica al complejo biotina-AuNP- ADN 1 mediante la interacción fuerte entre la biotina y la estreptavidina formando un complejo coloreado. En ausencia de los iones de mercurio (II) el complejo AuNPs-ADN1 se une tanto al ADN2 como a la estreptavidina revelando dos bandas. En el caso contrario, si el mercurio está presente, la banda que contiene el AuNPs-ADN1 puede unirse consigo mismo formando una estructura en forma de horquilla, mismo mediante la formación de los puentes de T-Hg-T, e impidiendo la posterior unión al ADN 2. En este caso solamente se observa una banda, la cual actúa como control¹⁶⁴. Los límites alcanzados por esta técnica son variados llegando a concentraciones mínimas de 5 nM en condiciones controladas de laboratorio.

El uso de anticuerpos específicos también ha sido explorados para amplificar la respuesta de la señal. En estos casos existe un diseño compuesto de cuatro zonas de inmovilización: La primera se compone de una cadena de ADN 1 conjugada a una molécula de digoxina (ADN - digoxina). La segunda zona se compone de una molécula de ADN 2 tiolada, unida a una nanopartícula de oro (AuNP-ADN 2). La tercer zona contiene el anticuerpo antidigoxina. Por último se encuentra la cuarta zona conformada por una molécula de estreptavidina unida a una biotina y a una hebra de ADN 3. Esta última con una secuencia complementaria a la de ADN 2. El principio de detección se basa en la formación del puente T-Hg^{II}-T conjuntamente con la capacidad específica de unión de los anticuerpos por la digoxina. En presencia de los iones de mercurio (II), el complejo ADN 1-digoxina interactúa con el AuNP-ADN 2 para generar un complejo supramolecular de AuNP-ADN1-ADN2-digoxina. Luego la mezcla migra a lo largo de la tira hasta que el complejo es finalmente capturado en la zona de revelado donde se encuentran los anticuerpos anti-digoxina. La acumulación de las nanopartículas de oro produce una banda roja característica, revelando la presencia de mercurio. Por su lado el exceso de AuNPs-ADN2 migra hacia la zona de control donde es capturado por el complejo de streptavidina-biotina-ADN 3 formando una

banda de control. Si por el contrario la concentración de mercurio es baja, la intensidad de la banda de detección se reduce o simplemente no aparece.

Una alternativa al desarrollo de tiras colorimétricas, son los sensores electroquímicos basados en el uso de nanopartículas. Esta clase de sensores buscan aumentar la sensibilidad sustituyendo la respuesta visual o espectrofotométrica, por señales eléctricas, las cuales son en principio más sensibles. Hoy en día se fabrican potenciostatos ultra pequeños y de costo reducido, por lo que estas combinaciones son igualmente atractivas para el análisis descentralizado.

Sensores combinados de nanopartículas con técnicas electroquímicas

La Agencia de protección medioambiental de los estados unidos (*Environmental Protection Agency*) provee de métodos electroquímicos para el análisis de mercurio en aguas, desde reservas industriales hasta aguas de uso doméstico¹⁶⁵. Sin embargo, estos métodos dependen de varios pre-tratamientos que no son fácilmente automatizables como el pulido y limpieza general de los electrodos. Esto afecta la aplicabilidad de las técnicas en campo, siendo necesarios algunos conocimientos mínimos de análisis electroquímico.

Para solucionar estos inconvenientes, en los últimos años se ha popularizado el uso de sensores descartables serigrafiados (o *screen-printed electrodes*)¹⁶⁶⁻¹⁶⁸. El uso de depósitos de nanopartículas en la superficie de los electrodos de trabajo, permite crear sistemas híbridos^{169,170} que potencian las respuestas analíticas¹⁷¹. Utilizando electrodos descartables, deja de ser necesario el uso de pre tratamientos y acondicionamientos de los electrodos de trabajo, permiten aumentar la velocidad de transferencia electrónica, reducen los fenómenos de sobre potencial y permite que las reacciones redox sean cinéticamente favorables¹⁷². Como ventaja adicional, el aumento de área generado por las nanopartículas, permiten bajar los límites de detección.

Una de las estrategias empleadas involucra el uso de los complejos de T-Hg^{II}-T conjugados a nanopartículas de oro las cuales en presencia de mercurio permiten la unión de las partículas a la superficie del electrodo recubierto con una hebra de ADN tiolada rica en timinas. Luego mediante el agregado de un ion electroquímicamente detectable como el

hexaminrutenio (III) el mismo puede unirse electrostáticamente al fosfato aniónico de ADN revelando la presencia de nanopartículas y por tanto de mercurio.

Los electrodos de carbono nano estructurados son otro ejemplo de vínculo entre los métodos electroquímicos y el uso de nanotecnología. La voltamperometría de *stripping* anódico, se potencia con el uso de nanopartículas de oro homogéneamente dispersas en los electrodos de grafeno, permitiendo disminuir los niveles de detección a 30 pM¹⁷³. Por otro lado el uso de otras nanoestructuras, como es el caso de los electrodos de nanotubos de carbono permite minimizar los efectos de contaminación comparado con el uso de carbono activado y/o fullerenos¹⁷⁴.

Pese a los avances en las estrategias de detección sigue siendo un desafío el estudio de estos sistemas en condiciones de factores de interferencia como son los ambientes salinos.

6.6 Una mirada crítica de los métodos de detección de mercurio

El interés en el análisis de mercurio depende principalmente en la detección del analito y su cuantificación en el ambiente, alimentos y trabajadores de la industria expuestos a contaminación del metal. Sin embargo, en todos los casos descritos anteriormente, los trabajos publicados mostraron pruebas de ensayo promisorias alcanzándose una sensibilidad y selectividad adecuada para el análisis de muestras en condiciones de laboratorio y en muestras reales poco frecuentes, como aguas prístinas de ríos y lagos¹⁵⁰. La mayoría de los trabajos reportados solamente se enfocan en disminuir los límites de detección, mostrando la selectividad de las técnicas solamente frente a otros cationes metálicos y dejando de lado factores como la fuerza iónica, el pH o el efecto del tipo de electrolito. Como se discutió previamente, este último tiene especial importancia en el caso de trabajar con nanopartículas de plata, y no es habitual encontrar estudios que demuestren la funcionalidad de los sensores desarrollados en presencia de halogenuros en general, de cloruro en particular, y de sulfuros inorgánicos y biotioles.

En consecuencia existen varios factores ambientales que limitan el uso de los métodos nanotecnológicos en medios reales, desmotivando las primeras etapas de laboratorio donde se mostraban promisorios para el análisis descentralizado. Los agentes de recubrimiento

empleados en la síntesis de nanopartículas juegan un rol crucial en el caso de la detección del mercurio dado que tienen la doble función de estabilizar los coloides y funcionar como moléculas de reconocimiento específico del mercurio. En algunos casos ambos objetivos entran en conflicto donde un aumento de sensibilidad se acompaña de una pérdida de selectividad y viceversa, haciendo difícil el traslado de la tecnología del laboratorio a la aplicación práctica en muestras reales.

No todas las nanopartículas son estables a alta fuerza iónica y pH extremos ⁹⁷. A modo de ejemplo las nanopartículas de oro recubiertas de citrato se agregan a concentraciones de cloruros tan bajas como 30 mM. En resumen, los sensores basados en la agregación de nanopartículas son extremadamente susceptibles a la agregación bajo condiciones normales de fuerza iónica. Aunque el problema podría en principio solucionarse con el empleo de otros agentes de recubrimiento, se dificulta el intercambio de ligandos, lo cual presenta un desafío en sí mismo muy rara vez estudiado (Figura 7) ¹⁷⁵.

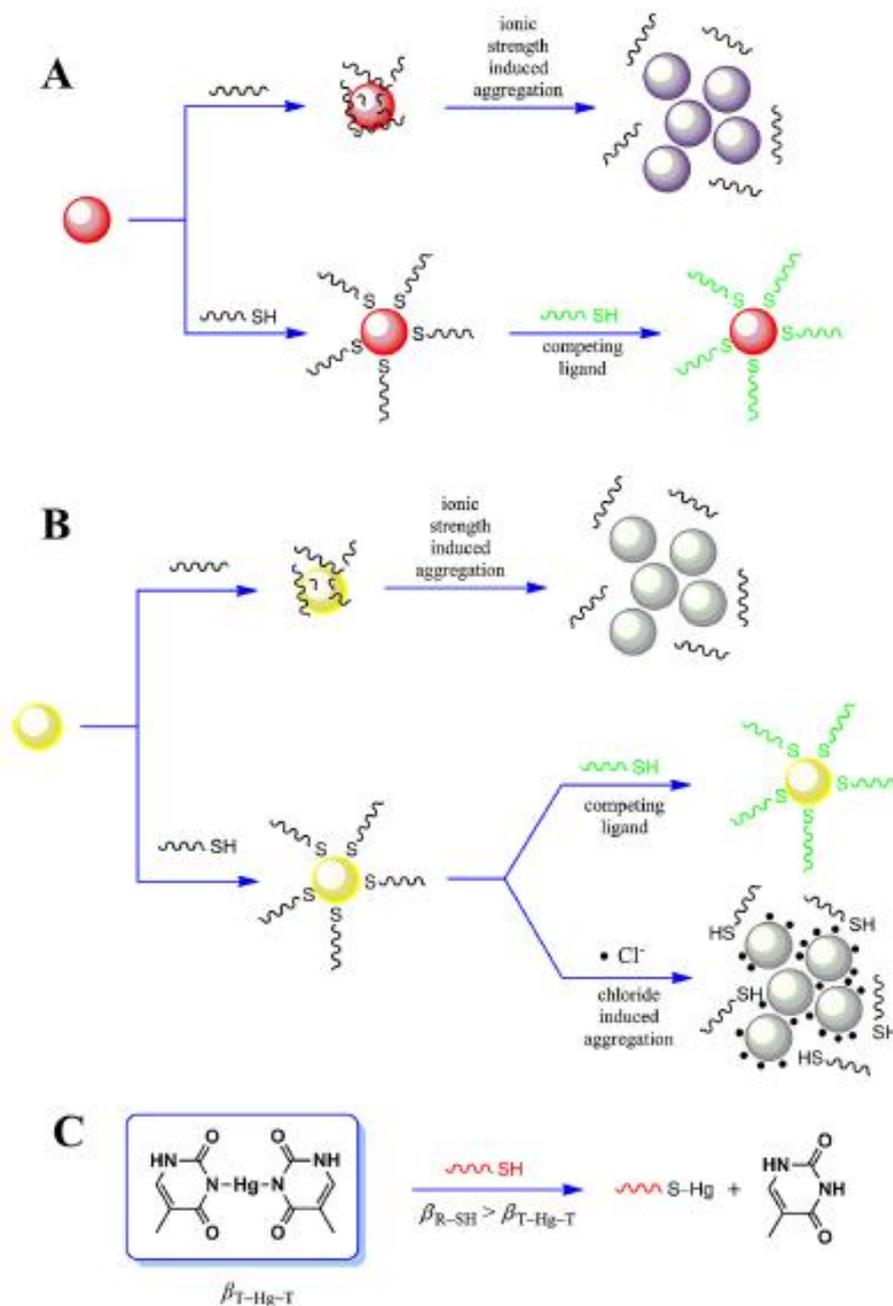


Figura 7: Posibles destinos de los sensores en ambientes reales: En el primer caso, las nanopartículas que se agregan con la presencia de bajos niveles de concentración salina aumentan su resistencia mediante el empleo de tioles, pero pueden ser sensibles al intercambio con otras moléculas tioladas(A). En el segundo caso, los tioles protegen a las nanopartículas de la fuerza iónica, pero electrolitos capaces de reaccionar con una alta afinidad, para formar sales insolubles con la plata (como el Cl^-), pueden generar de igual manera la agregación de las partículas (B). Por último los sensores basados en la formación de puentes $\text{T-Hg}^{\text{II}}\text{-T}$ pueden separarse en presencia de tioles con mayor afinidad por los mercurio (II) que las bases de timina desestabilizando a los sensores (C). Adaptado de referencia ⁵⁹.

La estabilidad del puente T-Hg^{II}-T también debe ser considerada, especialmente teniendo en cuenta de la gran mayoría de sensores basados en la formación de este complejo. Termodinámicamente, la estructura del mismo puede romperse frente a la presencia de grupos tioles, los cuales presentan una mayor afinidad por el mercurio. Existe evidencia que confirman estos datos donde moléculas de cisteína, glutatión y homocisteína son capaces de desplazar los átomos de mercurio (II) de su unión con las timinas¹⁵⁴.

Los métodos de formación de amalgamas por parte de las nanopartículas de oro y/o plata se muestran como las alternativas más simples y prometedoras, en cuanto a que el desarrollo se puede enfocar en el diseño de sistemas que soporten la agregación del medio, dejando la detección selectiva en manos de la formación directa de amalgamas, la cual es en principio más favorable termodinámicamente en la unión entre el mercurio y el tiol. Sin embargo estas técnicas son las menos exploradas y aún se encuentran en desventaja en términos de los límites de detección alcanzados y en cuanto a los estudios de interferencia y estabilidad de los coloides frente a la agregación de las nanopartículas.

El desarrollo de tiras de mercurio constituyen una buena alternativa para el análisis descentralizado al tiempo que resuelve alguno de los problemas anteriormente mencionados asociados a la agregación de partículas¹⁷⁶. Sin embargo estas técnicas son en general cualitativas o semi cuantitativas y en varios casos se sacrifica sensibilidad analítica.

En conclusión, no existe una técnica única y óptima del análisis de mercurio por métodos descentralizados. Los límites de detección de las técnicas reportadas son muy variados, no encontrándose un patrón claro que permita elegir entre una u otra técnica. Sin embargo hay un aspecto que surge con claridad de la revisión bibliográfica realizada: la necesidad de contar con sistemas analíticos adecuadamente validados en sistemas reales, o en soluciones simuladas de sistemas reales. La presencia de moléculas ubicuas como los iones cloruro, o la presencia de tioles y biotioles debe demostrar ser inocuas frente a la respuesta analítica del mercurio.

Capítulo VII: Estabilidad de las nanopartículas de plata

Una revisión cuidadosa de la literatura permite comprobar que la mayoría de los sensores propuestos, principalmente basados en el acercamiento de nanopartículas, han sido probados en condiciones de laboratorio, y rara vez se han empleado en el análisis de muestras reales. La razón de esto es sencilla: las nanopartículas se encuentran formando disoluciones coloidales, que son fuertemente dependientes de la fuerza iónica¹⁵⁻²². Al aumentar la fuerza iónica del medio, las nanopartículas pierden su recubrimiento y se agregan, cambiando de color. Si se emplearan estas nanopartículas, modificadas electrostáticamente con la adsorción de distintas moléculas de protección, en un medio de alta fuerza iónica, se produciría el agregado de las mismas y el sensor no funcionaría (falso positivo). Por tanto el análisis de la estabilidad de los coloides es esencial para el desarrollo de futuras aplicaciones.

En suma, resulta imprescindible profundizar en el conocimiento del fenómeno de agregación de nanopartículas, mediante el estudio de los diferentes parámetros que inciden en el mismo, con el objetivo de determinar racionalmente el mejor agente de recubrimiento, necesario para el posterior desarrollo de un sensor colorimétrico.

Por el año 2012 existían publicados numerosos trabajos que estudiaban el efecto de la fuerza iónica y/o el pH¹⁵⁻²², sin embargo, muy pocos autores subrayaban la importancia de la naturaleza del electrolito como responsable del proceso de agregación. Algunos de estos autores encontraron que las nanopartículas triangulares se agregaban de forma selectiva con aniones capaces de formar sales insolubles con la plata. Sin embargo la evidencia empírica de tal fenómeno era escasa. En virtud de esto, en el año 2013 a partir de los resultados parciales de la presente Tesis, se publicó por primera vez un trabajo en el cual se destaca la existencia de un mecanismo de agregación diferente del clásico efecto de la fuerza iónica (descrito por la teoría de DLVO), dependiente de la naturaleza de electrolito. En particular se encontró que los cloruros presentes en el medio eran capaces de agregar los coloides metálicos, mediante la formación de una capa de cloruro de plata alrededor de las partículas y la consecuente precipitación, al formar una sal insoluble con el metal. Al mismo

tiempo se dejó en claro la importancia del anión a la hora del diseño del sensor colorimétrico siendo indispensable para determinar la concentración máxima de trabajo que la nanopartícula es capaz de soportar.

7.1 Materiales y métodos

Todos los reactivos fueron utilizados en grado analítico y todas las disoluciones empleadas se prepararon con agua ultrapura (resistividad > 18.2 MΩ cm).

Nitrato de plata (AgNO_3 , 99%, Biopack), ácido sulfúrico (H_2SO_4 , 95-98%, Biopack) ácido nítrico (HNO_3 , 69.0-71.0% Biopack) cloruro de sodio (NaCl , 99% Anedra) hidróxido de sodio NaOH Cicarely, borohidruro de sodio (NaOH , 98%, Sigma). Almidón soluble (pureza analítica, Mallinckrodt), fluoruro de sodio (NaF , 99% J.T. Baker), nitrato de sodio (NaNO_3 , 99.5% Sigma-Aldrich) bromuro de sodio (NaBr , 99% Carlo Erba), bis(2-ethyl hexil) sulfosuccinato de sodio (NaAOT , 98%, Aldrich), glucosa (99% Sigma-Aldrich), citrato tri-sódico (TSC 99%, Carlo Erba). La pureza del borohidruro de sodio fue previamente evaluada de acuerdo al protocolo descrito por Botasini y Méndez⁶⁹.

Limpieza del material de vidrio

Todo el material de vidrio fue lavado empleando una mezcla de H_2SO_4 y HNO_3 concentrado en relación 1:1 (v/v), para eliminar cualquier contenido de plata presente, y luego se realizaron enjuagados exhaustivos con abundante agua ultrapura (resistividad > 18.2 MΩ cm).

Síntesis de nanopartículas de plata recubiertas de almidón

La síntesis de las nanopartículas de plata recubiertas con almidón se preparó agregando 3 mL de una solución 0.1 M de AgNO_3 a 200 mL de una disolución en exceso de almidón 0.20% (m/m) agitando la solución de forma vigorosa para acelerar la unión del agente protector a las nanopartículas. Luego, 6 mL de una disolución de borohidruro 0.1 M, preparado en el momento, se adicionó iniciando la reacción de síntesis; dónde se observa un color amarillo intenso inmediatamente después del agregado de borohidruro de sodio y luego, a medida que transcurre la reacción, se observa un leve oscurecimiento del color amarillo. La agitación se continuó durante 30 min, sin observación de cambios en el color de la solución.

La síntesis resultante se mide por espectrofotometría UV-Vis y finalmente se almacena a temperatura ambiente y en una zona con ausencia de luz. En todos los casos, al finalizar la síntesis se controló el valor de pH=7 de las soluciones, utilizándose tiras colorimétricas (Sigma-Aldrich).

Síntesis de nanopartículas de plata recubiertas de NaAOT

La síntesis de nanopartículas recubiertas de sulfosuccinato de sodio ¹⁰² se realizó agregando 3 mL de NaAOT 0.02M y 0.5 mL de AgNO₃ 0.1 M en un recipiente conteniendo 46 mL de agua ultrapura. La mezcla se agitó vigorosamente para asegurar la homogeneidad de la solución. La síntesis dio comienzo tras el agregado de 1 mL de NaBH₄ 0.1 M recientemente preparado y mantenido en un baño de hielo. El agitado continuó durante ca. 30 min adicionales y la disolución final se almacenó a temperatura ambiente y en ausencia de luz.

Síntesis de nanopartículas de plata "naked"

La síntesis de nanopartículas sin agente de recubrimiento se realizó siguiendo el protocolo descrito por Mulfinger et al. ¹⁷⁷ con ligeras modificaciones: Sobre un erlenmeyer conteniendo 30 mL de borohidruro de sodio 2.0 mM, en un baño de hielo y manteniendo un homogeneizado por agitación vigorosa, se agrega gota a gota 10 mL de una disolución de nitrato de plata 1 mM. A medida que transcurre el goteo se observa un cambio gradual de color, notándose un amarillo claro intenso al inicio, oscureciéndose poco a poco. Luego de finalizado el agregado del nitrato de plata, se continúa agitando la disolución durante 10 min. Concluido este tiempo, se agrega entonces el agente de recubrimiento para proteger las partículas. Es importante controlar en todo momento la velocidad con que se adiciona el agente de recubrimiento, dado que las nanopartículas *naked*, al estar estabilizadas únicamente por los iones adsorbidos, son metaestables. El agregado gota a gota, garantiza el crecimiento homogéneo de las nanopartículas, evitando la existencia de concentraciones locales diferentes tras el agregado de reactivo. Además el exceso de NaBH₄ permite que exista en todo momento un control termodinámico, necesario para la síntesis de nanopartículas esféricas.

Esta síntesis fue utilizada como punto de partida para comparar la eficacia en la protección de distintos agentes de recubrimiento.

Ensayos comparativos de los distintos agentes de recubrimiento

Para las pruebas comparativas entre los agentes de recubrimiento se empleó como punto de partida la síntesis de nanopartículas *naked* y sobre esta se adicionó una cantidad en exceso de los diferentes agentes de recubrimiento empleados: TBA, glucosa, NaAOT, citrato de sodio, y almidón, dejando reposar durante 1 hs para lograr el tiempo suficiente para que se genere un buen intercambio de los ligandos.

Medidas electroquímicas

Limpieza de los electrodos

Todos los electrodos de grafito empleados, tanto el de trabajo como el auxiliar fueron lavados en dos etapas, primero con abundante agua ultra pura, luego se realizó un decapado con papel y finalmente se realizó un segundo lavado. Por su parte también se realizó un lavado exhaustivo del electrodo de referencia, con abundante agua ultra pura.

Previamente a todas las medidas electroquímicas se realiza una corrida de control, para corroborar que no existe señal alguna y que la limpieza fue efectiva.

Preparación de la muestra

Para la determinación electroquímica del NaCl, los electrodos de trabajo de carbono grafito se incubaron por 24 hs en una disolución conteniendo las nanopartículas previamente sintetizadas para permitir la adsorción de las mismas sobre la superficie rugosa del carbono. El sistema electroquímico se completó con un grafito de mayor área superficial como electrodo auxiliar y calomel saturado como electrodo de referencia (SCE, 0.244 V-SHE a 20°C). Como electrolito soporte se utilizó una disolución de NaCl 1M.

Estabilidad de las nanopartículas recubiertas de almidón con el tiempo

Para los ensayos de estabilidad, se preparan las nanopartículas de plata *naked* y sobre estas se agregó a los 10 min de terminada la reacción, el almidón (al 1% m/m) como agente estabilizante. Luego se tomó una alícuota de 2 mL, se filtró (con un filtro de 0.2 μ de tamaño de poro promedio) y se midió el radio hidrodinámico; de la misma forma, se tomaron otra alícuota de 2 mL para las medidas en paralelo de los espectros UV-Vis. Ambas muestras

fueron almacenadas en las propias celdas de medida, cerradas, a temperatura ambiente y en ausencia de luz.

Simulaciones de los espectros UV-Vis

Las simulaciones teóricas de los espectros de absorción UV-Vis basados en la resolución de las ecuaciones de Maxwell, se calcularon mediante el programa *MiePlot* versión 4.4¹⁷⁸, calculando los espectros para partículas esféricas en el rango de 200 a 900 nm, con cálculos cada 1 nm, empleando en la determinación del índice de refracción de la componente imaginaria y compleja la aproximación de Segelstein¹⁷⁹.

Estabilidad de las nanopartículas recubiertas de almidón con el aumento de temperatura

Las medidas de estabilidad se realizaron sumergiendo una alícuota de 3 mL en un baño termostatzado durante 15 min, en el rango de temperaturas entre 25 y 90°C; recolectando los espectros de cada muestra de forma inmediata.

Equipamiento empleado

Estudios por espectroscopía electrónica UV-Vis-NIR

Las medidas de espectroscopía UV-Vis-NIR se realizaron en un espectrofotómetro *UV-1603 Shimadzu* (Japón) utilizando celdas de cuarzo de 1 cm de camino óptico. En el caso de las disoluciones coloidales, se registró hasta el rango del IR cercano (900 nm), de manera de detectar posibles agregados de nanopartículas, que suelen absorber por encima de los 600 nm. Todos los espectros se realizaron a una velocidad de barrido de longitud de onda de 5 nm s⁻¹. Los espectros se visualizaron utilizando el programa UVPC de *Shimadzu*.

Equipamiento electroquímico

Las medidas electroquímicas se llevaron a cabo en un potencióstato *Voltalab PGZ 301* de la firma *Radiometer* (Holanda).

Estudios por microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Las medidas de microscopía electrónica de Transmisión (TEM) se realizó en un equipo JEOL *Microscope JEM* modelo 1010 con una aceleración de voltaje de 100 kV. Para las medidas se adicionaron 10 μL de una disolución de nanopartículas con una concentración equivalente a ca. 1 unidad de absorbancia, sobre una grilla de cobre-carbono. Esta última se secó a temperatura ambiente.

Estudios por difracción de rayos X (XRD)

Las medidas de XRD se realizaron en un difractómetro Philips PW3710 usando una radiación de Cu $K\alpha$. Las muestras se prepararon por deposición de 20 μL de una disolución concentrada de nanopartículas sobre un portaobjetos de vidrio.

Estudios de dispersión de luz (DLS)

Las medidas de radio hidrodinámico, fueron realizadas empleando un equipo de dispersión de luz de ángulo fijo (DLS) marca *Brookhaven*, en solución acuosa a 25°C con una fuente de luz laser a 659 nm de longitud de onda, con un ángulo fijo de medida a 90° y utilizando un algoritmo de distribución de tamaño de tipo continuo. Se realizaron 5 corridas de 10 min cada una, con un filtro de polvo del 30%.

7.2 Resultados y discusión

Síntesis de las nanopartículas de plata esféricas

Como se mencionaba en el capítulo IV, debido a la infinidad de técnicas de síntesis disponibles, la elección del método adecuado no es una tarea sencilla, dado que no existe un criterio único que permita elegir el mejor agente de recubrimiento y protocolo a utilizar, siendo la elección correcta en cierto modo una suerte de ensayo y error. Más aún la teoría de crecimiento de las nanopartículas en muchos sentidos se asemeja al crecimiento cristalino⁹⁵, donde pequeñas modificaciones del entorno pueden generar variaciones grandes del producto final que se traduce en nanopartículas con morfologías bien diferenciadas⁸⁵. Sin embargo, existen algunos indicios que pueden ser utilizados para facilitar la elección más adecuada, como el conocer la naturaleza química del agente

protector (electroestático, estérico, electroestérica) y las concentraciones del agente reductor (control cinético vs. termodinámico, capítulo IV)⁶⁹.

Para el caso concreto del presente trabajo, la elección del agente de recubrimiento se realizó teniendo en cuenta el objetivo último de lograr un sistema coloidal con un cierto grado de resistencia frente a los posibles agentes externos. En este sentido, los agentes de recubrimiento estéricos son los más prometedores, dado que en principio no son tan afectados por cambios en el pH o la fuerza iónica. También hoy en día existe una tendencia a nivel global de utilizar reactivos inofensivos para el medio ambiente, por lo que se buscan sustancias naturales y biocompatibles, como el almidón.

Teniendo todo esto en cuenta, como punto de partida se eligió trabajar con nanopartículas sintetizadas mediante la técnica de Brust⁹², la cual utiliza el borohidruro de sodio como agente reductor. El alto poder redox, junto con el hecho de trabajar con un exceso del reactivo, aseguran la permanencia de un control termodinámico que definen la formación de nanopartículas esféricas, al tiempo que la síntesis no requiere de elevadas temperaturas, siendo en suma un método sencillo y efectivo.

Como surfactante, se seleccionó un agente representativo de cada uno de los tipos de naturaleza protectora: como agente estérico el almidón, covalente el TBA, electroestérico el NaAOT y electroestático el citrato y la glucosa. Dado que los protocolos publicados para cada uno de los reactivos es distinto, se eligió emplear un cambio de ligando, tomando como síntesis inicial a las nanopartículas *naked*, preparadas únicamente mediante el agregado del nitrato de plata y el borohidruro de sodio, que actúa como agente protector y estabilizante^{177,180}. La síntesis de nanopartículas por este último método es una técnica confiable y fácilmente reproducible, que genera nanopartículas estables por un par de horas, en ausencia de otro agente protector de mayor fuerza; en cuyo caso la estabilidad puede durar días o semanas. De esta forma los experimentos de comparación entre los agentes de recubrimientos tienen una sola variable física siendo esta el propio agente protector empleado, el cual se agrega inmediatamente luego del sintetizado de las partículas *naked*. La concentración es otro aspecto a controlar a la hora de evaluar el agente. En principio uno desearía que fuera suficiente para cubrir completamente todas las partículas, dado que lo importante es mantener la estabilidad del coloide. Sin embargo

como muestra la Figura 1, concentraciones en exceso de algunos agentes de recubrimiento pueden repercutir negativamente en la estabilidad del coloide. Entre los casos ensayados el almidón fue el único agente capaz de poder ser agregado en exceso sin generar cambios significativos en el perfil del espectro UV-Vis de las partículas, mientras que por el contrario para los restantes casos se observa una caída en los espectros de absorción del máximo a 400 nm y un aumento de las absorbancias a longitudes de onda mayores, lo cual es característico del proceso de agregación de las nanopartículas. La razón de este fenómeno se atribuye a que a altas concentraciones, existen interacciones inter-partículas las cuales generan agregados, que en muchos casos podrían incluso dar lugar a la formación de precipitados. El fenómeno más claro se visualiza con el TBA, donde el agregado en exceso del reactivo produce una notoria caída del máximo de absorción a 400 nm, quedando únicamente las señales de la propia molécula de TBA. Esto es posible debido a las interacciones intermoleculares mediadas por la formación de puentes de hidrógeno entre los grupos N-H y los aceptores oxígenos o el azufre de la propia molécula de TBA (Figura 2)¹⁸¹.

Por su parte, la razón de la excelente protección del almidón se atribuye al mecanismo de protección estérico que genera la gran molécula formada por un largo encadenamiento de glucosas por medio de enlaces α (1 \rightarrow 4)¹⁸².

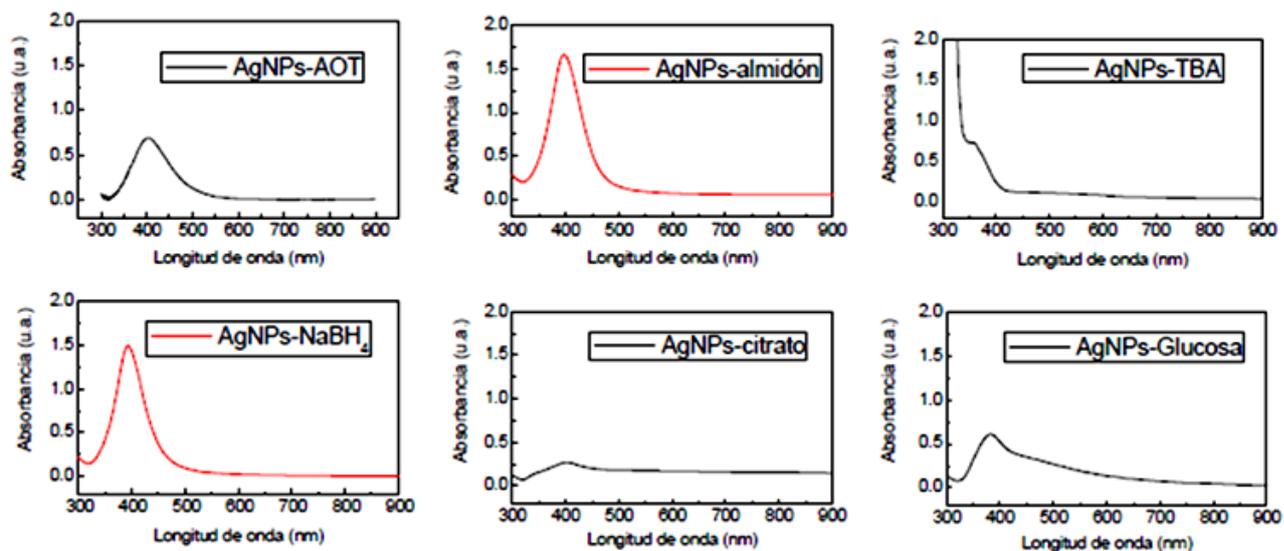


Figura 1: Efecto del agente de recubrimiento agregado en exceso sobre la estabilidad de las nanopartículas.

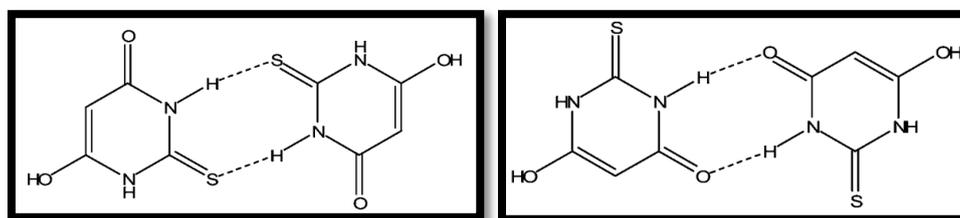


Figura 2: Dos de las 8 posibles formas tautoméricas del TBA, para ejemplificar la capacidad de la molécula de formar puentes de hidrógeno con sus pares vecinas Adaptado de referencia ¹⁸¹.

En resumen, se elige como punto de partida de trabajo a la técnica de Brust ⁹² como método de síntesis empleando al almidón como agente de recubrimiento.

Las nanopartículas sintetizadas por esta técnica presentan un tamaño promedio de entre 10-20 nm según las imágenes de microscopía TEM (Figura 3), observándose el comportamiento típico de ajuste a una curva log-Normal. Este tamaño reducido se corresponde con el máximo de absorbancia ubicado a valores levemente por debajo de los 400 nm correspondiente a la absorción de luz generada por la oscilación colectiva de electrones del modo cuadrupolar de las nanopartículas.

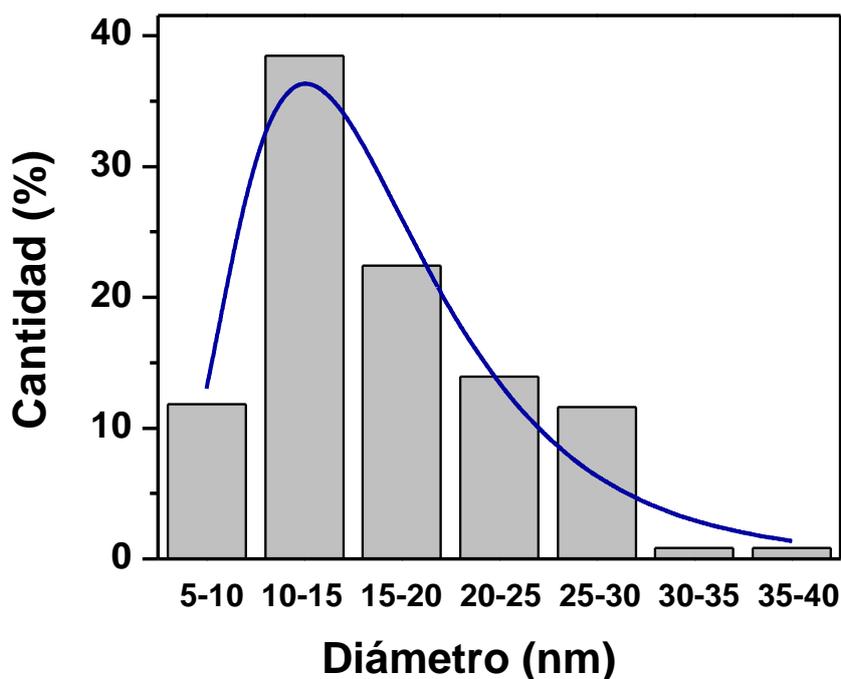


Figura 3: Distribución de las poblaciones de las nanopartículas de plata.

Las simulaciones computacionales utilizando la teoría de Mie (Figura 4), permiten predecir un máximo de absorción a 389 nm para partículas de 20 nm de diámetro, lo cual se ajusta bastante bien a los datos experimentales, donde el máximo de absorbancia a valores ligeramente menores a 400 nm son un indicativo de la presencia de nanopartículas en este entorno de 20-30 nm de diámetro. El gráfico permite visualizar el efecto del grado de dispersión de la distribución de poblaciones sobre el espectro de absorción de las nanopartículas, dado que el gráfico experimental se compone de la sumatoria de las absorciones de cada una de las poblaciones presentes, que para el caso de muestras muy polidispersas es esperable contar con valores grandes en el ancho medio de los picos de absorción.

Por otro lado las simulaciones permiten entender las altas fluctuaciones que se observan en los valores de absorbancia al transcurrir el tiempo, puesto que los índices de absorptividad molar cambian significativamente frente a variaciones pequeñas en la longitud de onda, las cuales a su vez dependen del tamaño de las partículas. En otras palabras cambios en la distribución de poblaciones puede ocasionar que la absorbancia disminuya o aumente dependiendo del tamaño de las partículas. En el gráfico de la Figura 4 se visualiza claramente este efecto, puesto que el máximo en la capacidad de absorción de luz se ubica

a 394 nm correspondiente a las nanopartículas de 15 nm de radio, por encima y por debajo de este tamaño se ve una caída en los valores de extinción de luz.

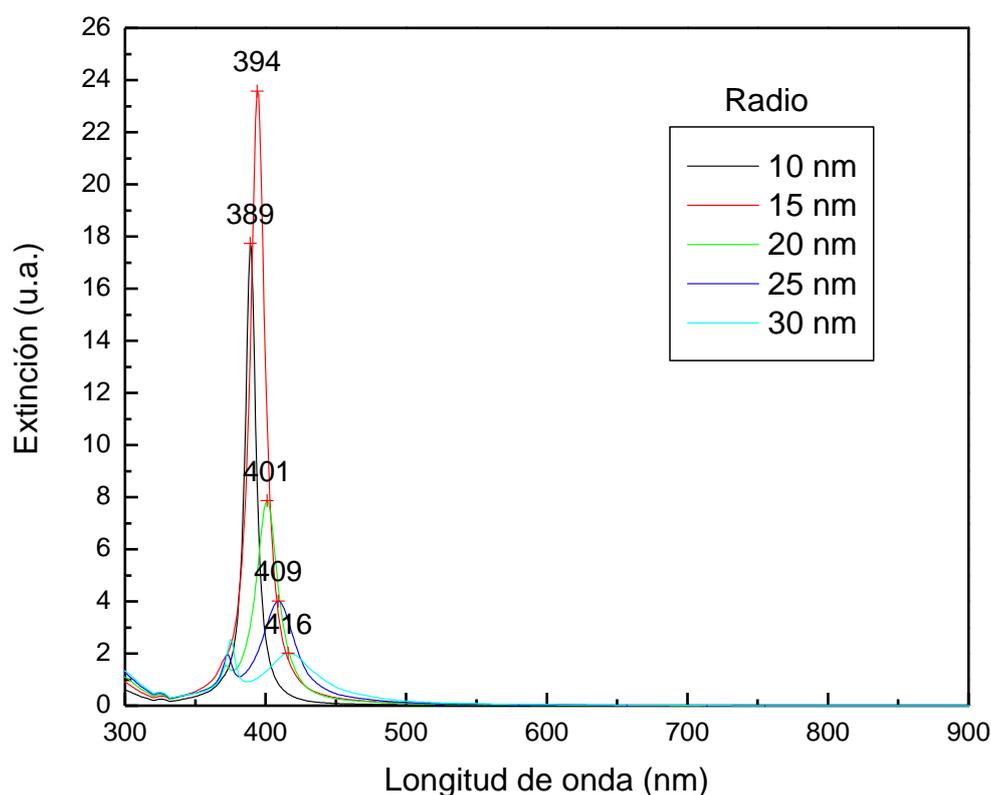


Figura 4: Simulaciones de Mie de los espectros de absorción UV-Vis para nanopartículas de plata de diferentes tamaños y en medio acuoso, utilizando el programa libre MiePlot 4401 ¹⁷⁸.

El diámetro hidrodinámico efectivo promedio entre síntesis independientes fue de 32.65 ± 5.69 nm con un índice de polidispersión medio de 0.321 ± 0.014 . La gran sobrevaloración del diámetro medido por la técnica de DLS en comparación al recuento estadístico de las imágenes de microscopía se atribuye al tamaño de la molécula de almidón, la cual envuelve a las partículas aumentando considerablemente su diámetro hidrodinámico. Además, es importante aclarar que el diámetro efectivo medido por el método de cumulantes en general tiende a sobrevalorar los tamaños reales de las muestras polidispersas, dado que expresa el promedio aritmético de todas las poblaciones presentes, en donde las partículas de gran tamaño tienen un peso relativo mayor en la cantidad de luz dispersada que las partículas pequeñas. En este sentido, el análisis de distribución multimodal de intensidades por DLS permitió identificar 3 poblaciones cuyos tamaños promedio se estiman en 3 nm, 12 nm y 73 nm (Figura 5), siendo el segundo correlativo con el valor de tamaño obtenido de las imágenes por microscopía. Sin embargo es justo aclarar

que esta distribución solamente es válida en virtud de que los resultados son correlativos con las imágenes de microscopía, dado que el análisis de distribución multimodal puede presentar errores grandes en la estimación de los resultados, para el caso de muestras polidispersas, como en el caso nuestro.

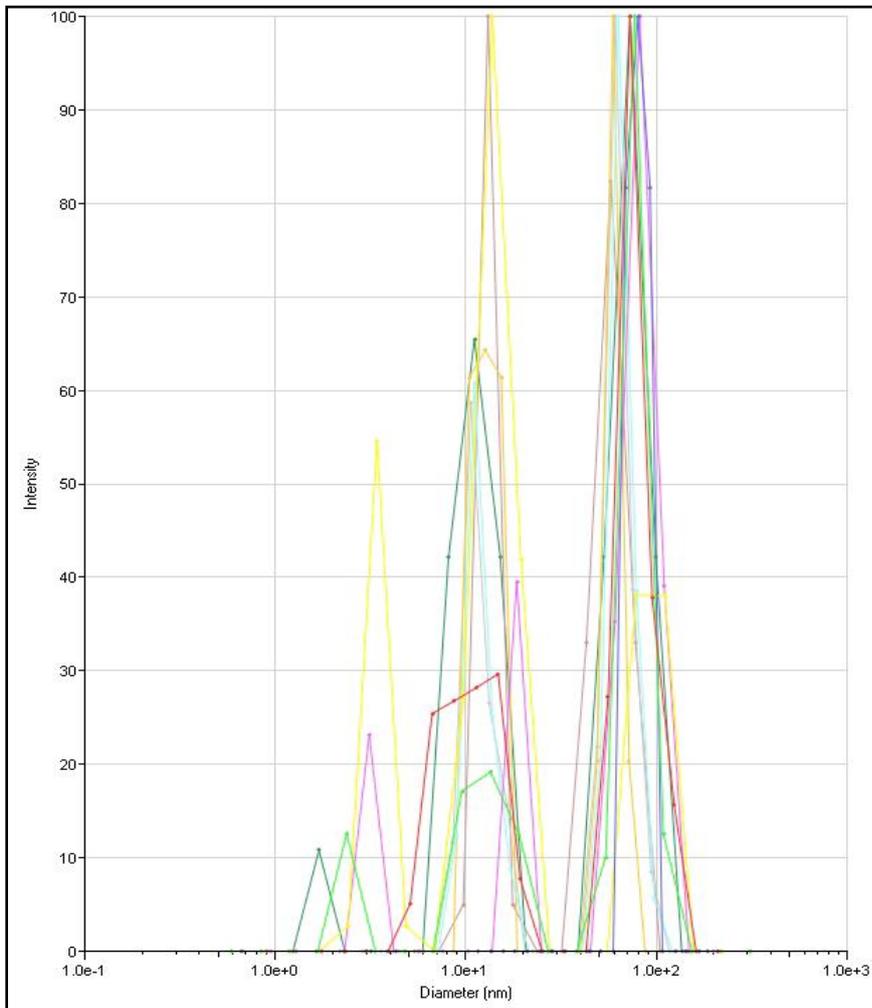


Figura 5: Análisis multimodal de distribución de tamaños de las nanopartículas, por DLS, mediante el cálculo empleado por el algoritmo CONTIN.

Estabilidad de las nanopartículas recubiertas de almidón con el tiempo de almacenamiento

A simple vista es notoria la estabilidad que brinda el almidón a las nanopartículas, en comparación con los preparados de partículas *naked*, evitando los cambios de color que se observan durante los procesos de agregación y precipitación de las partículas en las primeras horas luego de realizada la síntesis. Puesto que es deseable contar con sistemas coloidales estables en el tiempo, se realizó un estudio durante un mes, dónde se evaluaron 3 parámetros: radio hidrodinámico, absorbancia y posición del máximo de absorción.

Para el caso del radio hidrodinámico, se observa una leve disminución del tamaño de las partículas durante la primera semana de medida, para luego estabilizarse en ca. 34 nm durante los días restantes de medida (Figura 6).

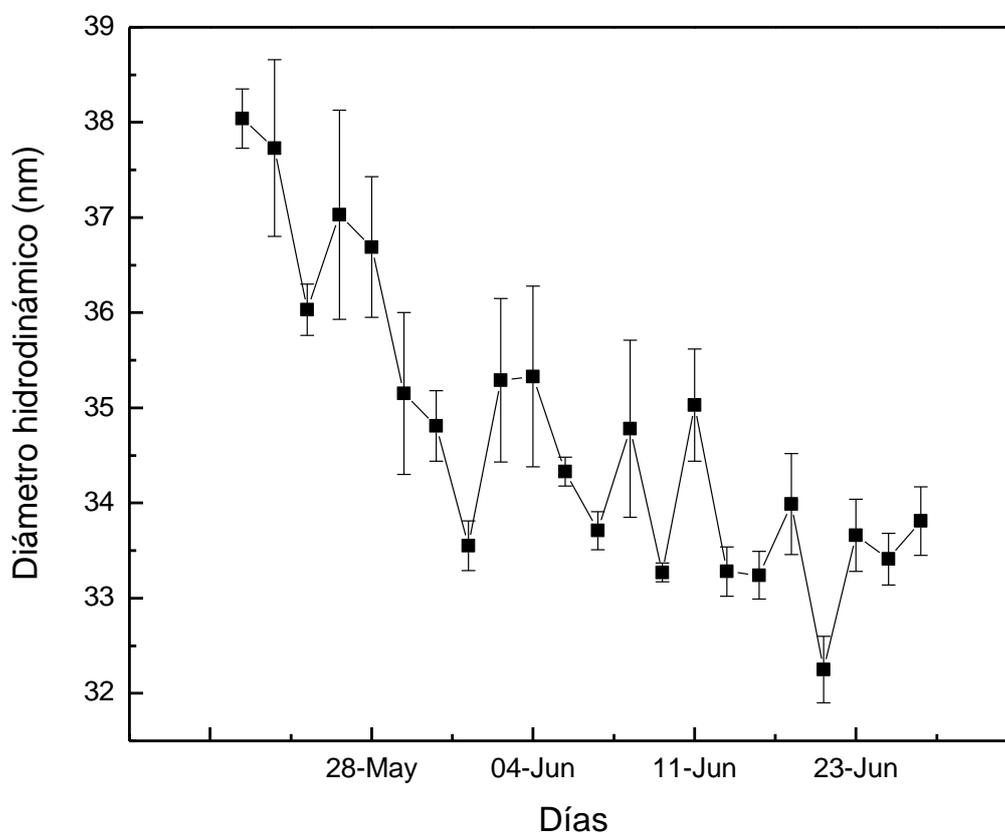


Figura 6: Evolución del diámetro hidrodinámico de las nanopartículas recubiertas de almidón con el tiempo.

Por su lado, no se observaron cambios significativos en los valores de absorbancia de las muestras, lo cual sugiere que el pequeño cambio en el tamaño de las nanopartículas no afecta la absorbancia de la muestra (Figura 7).

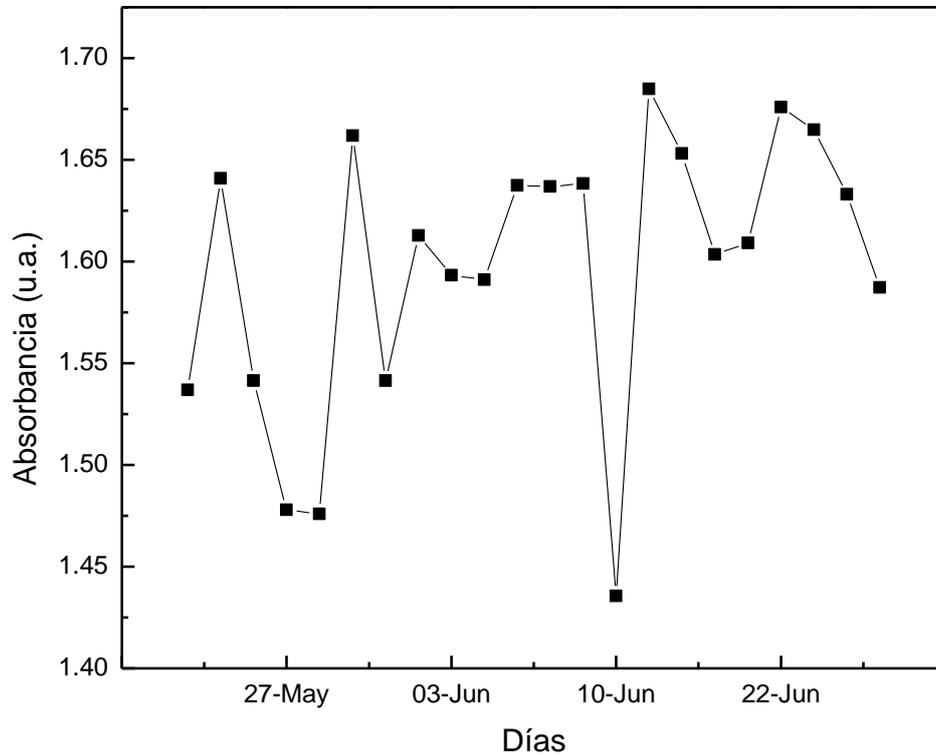


Figura 7: Evolución del máximo de absorbancia de las nanopartículas respecto al tiempo de almacenamiento a temperatura ambiente.

Finalmente, se observa un corrimiento notorio hacia longitudes de onda de menor energía, del máximo de absorción en el primer día de síntesis, para luego estabilizarse durante los restantes 16 días, a partir del cual se observa un nuevo corrimiento en la misma dirección de longitud de onda (Figura 8).

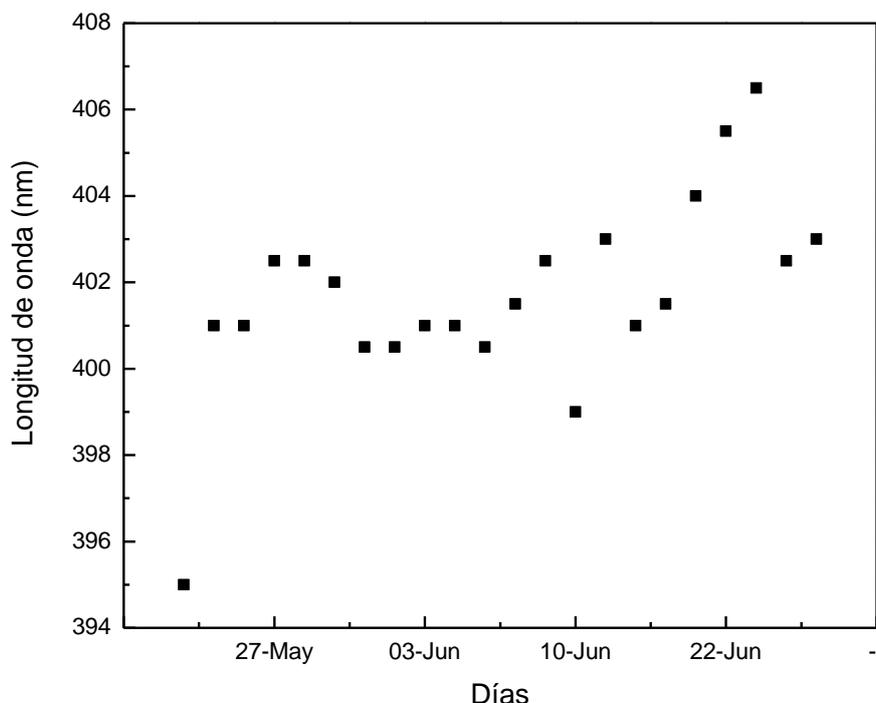


Figura 8: Evolución de la longitud de onda respecto al tiempo de almacenamiento de las partículas

El análisis comparativo de los distintos experimentos, permite dilucidar el panorama completo del proceso de evolución de las nanopartículas de plata. En primer lugar se destaca que durante los primeros días se observa un leve cambio tanto en el tamaño como en la respuesta colorimétrica, lo cual indica que el efecto de la protección de almidón no se establece de forma completamente inmediata, sino que es necesario esperar un tiempo suficiente para que se genere el intercambio de ligando. Esto podría explicar también la disminución del tamaño de las nanopartículas, dado que la presencia de almidón podría ser suficiente para cambiar la carga superficial de la partícula generando que el radio hidrodinámico disminuya, producto del acortamiento de la doble capa electroquímica, más que por un cambio efectivo del tamaño de la partícula.

Otra posible explicación de estos cambios podría estar vinculada a un simple efecto de decantación de partículas grandes. Esto explicaría porqué se observa un cambio significativo en radio hidrodinámico sin repercutir con el mismo peso en el espectro de absorción, dado que las partículas grandes al estar presentes en baja concentración, no son suficientes para cambiar los valores finales de absorbancia y/o longitud de onda, pero sí puede detectarse

en las medidas de DLS, dado que la intensidad de luz dispersada por las partículas grandes es de varios órdenes de magnitud mayor que la dispersada por las nanopartículas pequeñas. La disminución en los valores de los índices de polidispersión (Tabla 1) con el tiempo sugieren que esta última hipótesis podría ser la responsable del fenómeno observado, dado que la baja en el índice de polidispersión puede traducirse en una reducción de la diversidad de tamaños presentes en solución.

En resumen, estos estudios permitieron determinar que luego de la síntesis de nanopartículas, es recomendable esperar al menos 24 hs para que se logre una protección completa, sugiriendo almacenarlas a bajas temperaturas, para minimizar la cinética vinculada a los procesos de agregación.

Tabla 1: Evolución del tamaño y la polidispersión con el tiempo de almacenamiento.

Día	Diámetro efectivo nm	Desviación estándar	Polidispersión	Desviación estándar
22-May	38.04	0.31	0.335	0.003
25-May	37.73	0.93	0.332	0.003
26-May	36.03	0.27	0.331	0.002
27-May	37.03	1.1	0.334	0.002
28-May	36.69	0.74	0.332	0.001
29-May	35.15	0.85	0.331	0.002
01-Jun	34.81	0.37	0.33	0.002
02-Jun	33.55	0.26	0.328	0.003
03-Jun	35.29	0.86	0.332	0.002
04-Jun	35.33	0.95	0.33	0.002
05-Jun	34.33	0.15	0.327	0.002
08-Jun	33.71	0.2	0.327	0.002
09-Jun	34.78	0.93	0.329	0.001
10-Jun	33.27	0.1	0.327	0.002
11-Jun	35.03	0.59	0.327	0.005
12-Jun	33.28	0.26	0.326	0.002
15-Jun	33.24	0.25	0.327	0.001
16-Jun	33.99	0.53	0.327	0.002
22-Jun	32.25	0.35	0.323	0.001
23-Jun	33.66	0.38	0.323	0.001
24-Jun	33.41	0.27	0.321	0.002
25-Jun	33.81	0.36	0.324	0.001

Estabilidad de las nanopartículas de almidón frente al aumento de temperatura

La Figura 9 muestra el efecto que tiene el aumento de la temperatura sobre las nanopartículas de plata, observándose los primeros cambios a partir de los 40 °C con una ligera disminución del máximo de absorbancia a 408 nm. Esto indica que el sistema es estable en las condiciones de trabajo de temperatura ambiente, observándose cambios solamente a temperaturas elevadas.

A partir de los 80°C se observa un corrimiento del máximo hacia longitudes de onda de mayor energía concomitantemente con un aumento de la absorbancia a 800 nm lo cual sugiere que ante temperaturas elevadas las nanopartículas sufren un proceso de agregación. El corrimiento en la longitud de onda, hacia la zona de mayor energía, sugiere que existe un cambio en la distribución de la población donde prevalecen las nanopartículas pequeñas y los agregados.

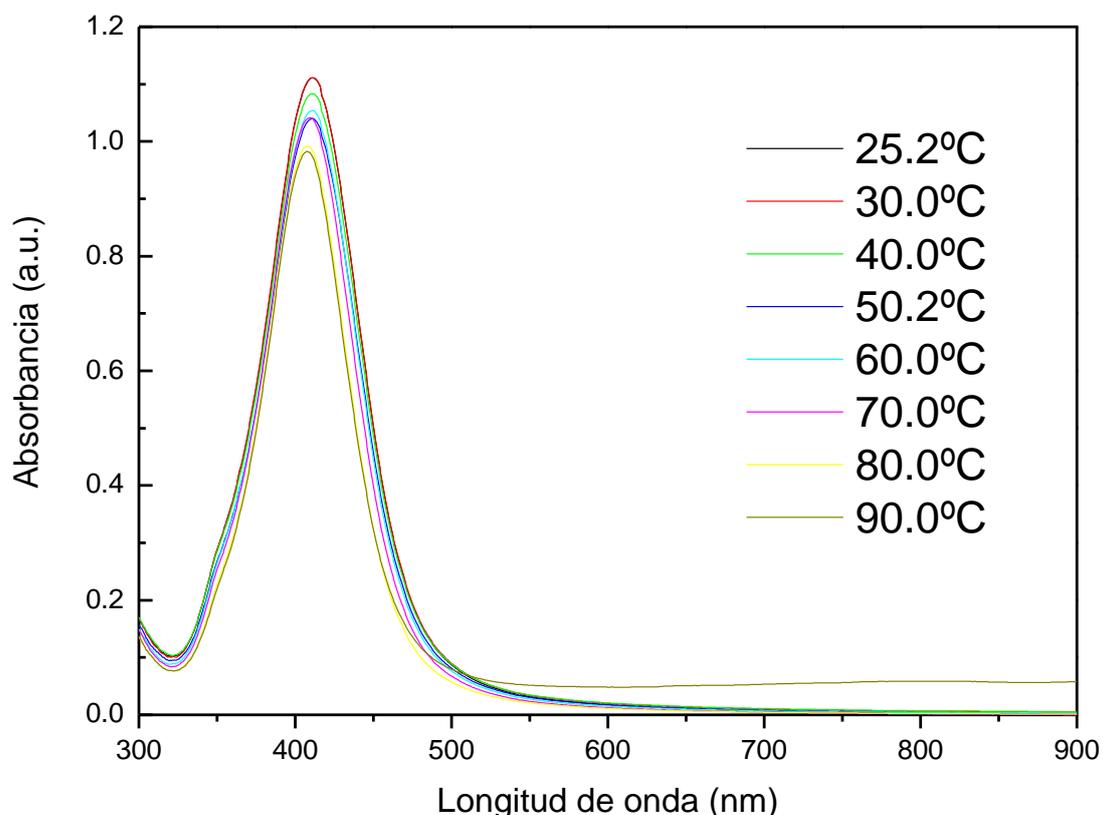


Figura 9: efecto de la temperatura sobre las nanopartículas recubiertas de almidón.

Estabilidad de las nanopartículas de almidón frente al agregado de sales

Durante la impronta experimental de los estudios de estabilidad, se observó una diferencia notable en los perfiles de agregación dependiendo de la naturaleza del electrolito y del agente de recubrimiento empleado. Más aún los resultados indican que el verdadero mecanismo detrás de la formación de agregados no sigue la línea clásica fundamentada en la teoría DLVO, sino que se observan diferencias debido al agente empleado.

La Figura 10 muestra un ejemplo del mecanismo de agregación diferencial de las nanopartículas de almidón, donde se no se observan cambios significativos en la banda máxima del espectro electrónico de absorción de las nanopartículas, frente a la adición de concentraciones crecientes de NaNO_3 o NaF (Figura 10 e y f). En cambio, frente a la presencia de otras sales como el NaCl y el NaBr (Figura 10 a y c) se observa una rápida disminución de la absorbancia de la banda máxima del plasmón de las nanopartículas a 400 nm conjuntamente con un aumento uniforme de la absorbancia a longitudes de onda de menores energía. Este es el comportamiento típico observado para los fenómenos de agregación de las nanopartículas, el cual queda representado en ajustes a curvas sigmoideas, de acuerdo al modelo matemático que se describe en el capítulo siguiente. Dentro de este contexto, las figuras 10 b y c ilustran la fracción de nanopartículas no agregadas (libres) en solución al variar la concentración de sales presentes. En apartados posteriores se profundiza sobre estos fenómenos observados, determinándose al final un mecanismo que permite explicar en profundidad el comportamiento de agregación desigual.

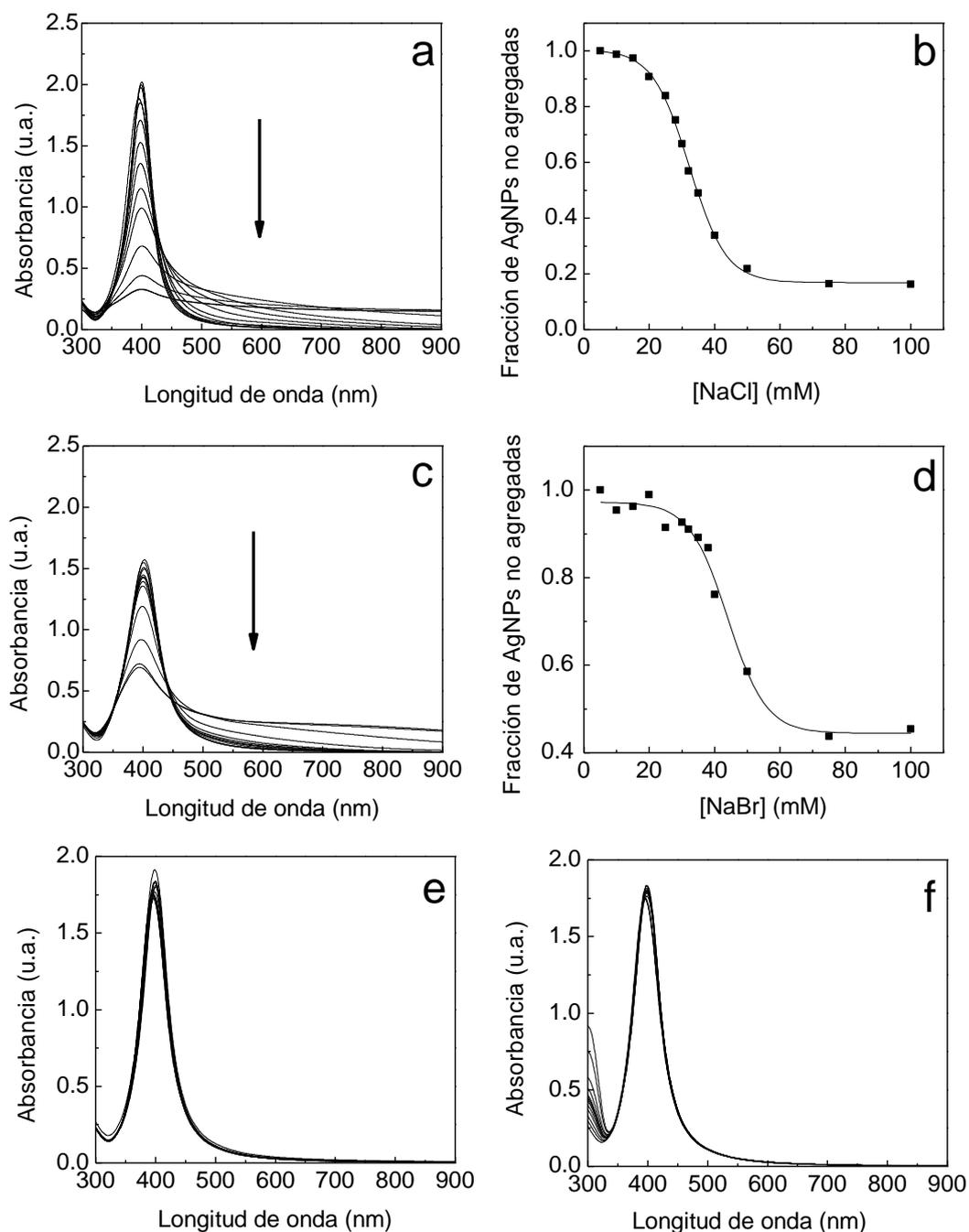


Figura 10: Espectros UV-Vis-NIR de las AgNPs recubiertas con almidón frente a concentraciones crecientes de NaCl **(a)** y NaBr **(c)**, respectivamente. Fracción de AgNPs no agregadas vs. concentraciones crecientes de NaCl **(b)** y NaBr **(d)**, respectivamente. Las fracciones se calcularon por normalización del máximo a 400 nm. Espectros UV-Vis-NIR en presencia de concentraciones crecientes de NaF **(e)** y NaNO_3 **(f)**, respectivamente. Adaptado de referencia ¹⁰².

Propuesta de un modelo de estudio del proceso de agregación de las nanopartículas de plata en ambientes reales

Teniendo en cuenta la gran cantidad de factores involucrados en el proceso de agregación de las partículas, resultaría compleja y tediosa la tarea de evaluar por separado cuál o cuáles son los factores más relevantes a la hora de elegir el mejor agente estabilizantes (Capítulo VII). En consecuencia es deseable poseer de un criterio unificado que involucre todos los parámetros mencionados, permitiendo a partir de experiencias simples obtener información sobre el estado coloidal de las partículas, así como también clasificar el mejor agente estabilizante a ser utilizado en cada caso. En este sentido la interdependencia de los distintos factores que afectan la estabilidad de las nanopartículas tienen la ventaja de poder estudiarse en conjunto, aplicando un enfoque termodinámico.

Antes de continuar es importante aclarar que todos los procesos de agregación de coloides tienen siempre asociado una componente termodinámica y cinética que describen completamente al sistema. Sin embargo, la última no será tomada en cuenta para el modelo de estudio propuesto, asumiendo en todos los casos que se trabaja en condiciones de equilibrio o a lo sumo de cuasi-equilibrio termodinámico. También se dejan de lado los fenómenos de maduración de Ostwald (Capítulo II).

Fundamento del modelo

El estado inicial se caracteriza por las nanopartículas de plata libres (en solución) estabilizadas por la presencia de una capa de agente de protección que las envuelve y evita su agregación. Este estado se considera estable o al menos meta estable termodinámicamente y por tanto no se generará la agregación a menos que se cambien las condiciones del medio. Por su parte el estado final se caracteriza por las partículas agregadas. En resumen, el proceso que se describe es el proceso de agregación y sistema se representa como por el equilibrio entre dos estados posibles: Las nanopartículas agregadas y las nanopartículas libres.

Matemáticamente se puede expresar el proceso como:



Dado que la posición del equilibrio depende de la naturaleza de agente de recubrimiento (AR) y de la composición del medio, la misma dependerá no solamente de la temperatura, sino que también de los factores extrínsecos responsables del proceso de agregación, llámesele "factor extrínseco (FE)". Entre estos últimos, la fuerza iónica así como también la naturaleza de algunos aniones particulares, serán los más relevantes. En este contexto la constante de equilibrio puede denotarse como $K_{T,FE}^{AR}$, cuyo calculo dependerá del cociente entre fracción de partículas agregadas y la fracción de nanopartículas libres:

$$K_{T,FE}^{AR} = \frac{f_{agregadas}}{f_{libres}} = \frac{1-f_{agregadas}}{f_{libres}} \quad (2)$$

siendo la fracción libre igual a:

$$f_{libres} = \frac{1}{1+K_{T,FE}^{AR}} \quad (3)$$

Luego, bajo determinadas condiciones experimentales la constante de equilibrio se relaciona con la energía libre de Gibbs para el proceso de agregación (ag) representado como:

$$\Delta_{ag} G_{T,FE}^{AR} = -RT \ln(K_{T,FE}^{AR}) \quad (4)$$

La expresión de la energía libre de Gibbs define un criterio de espontaneidad del proceso de agregación determinando que para cierta concentración límite de agente agregante, el proceso se hace espontáneo, mientras que a bajas concentraciones no ocurre agregación. La dependencia de la energía de Gibbs con la concentración del medio puede ser establecida experimentalmente mediante el método de extrapolación lineal (MEL), determinando un valor específico de energía libre para concentraciones nulas de agente.

El método MEL puede esquematizarse matemáticamente en:

$$\Delta_{ag} G_{T,FE}^{AR} = -mC_{FE} + \Delta_{ag} G_{T,FE=0}^{AR} \quad (5)$$

donde m es el coeficiente de ajuste C_{FE} la concentración del agente utilizado y $\Delta_{ag} G_{T,FE=0}^{AR}$ el valor de la energía libre a concentración nula de agente.

Cuando la concentración de agente alcanza la concentración crítica (C_{FE}^{crit}) necesaria para que el proceso se vuelva espontáneo ($\Delta_{ag} G_{T,FE}^{AR} = 0$) la constante de equilibrio $K_{T,FE}^{AR} = 1$ y $\Delta_{ag} G_{T,FE=0}^{AR} = mC_{FE}^{crit}$. Luego la ecuación 5 puede reescribirse como:

$$\Delta_{ag} G_{T,FE}^{AR} = m(C_{FE}^{crit} - C_{FE}) \quad (6)$$

Combinando y re arreglando las ecuaciones 2 y 6 se obtiene:

$$f_{libre} = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{\Delta_{ag} G_{T,FE}^{AR}}{RT}\right)} \quad (7)$$

$$f_{libre} = \frac{1}{1 + \exp\left[\frac{m(C_{FE}^{crit} - C_{FE})}{RT}\right]} \quad (8)$$

Esta última expresión tiene la forma de una sigmoidea de Boltzmann para valores de $A_1=1$ y $A_2=0$:

$$f(x) = \frac{A_1 - A_2}{1 + \exp\left[-\frac{(x_0 - x)}{d}\right]} + A_2 \quad (9)$$

Las medidas de la fracción libre de nanopartículas a cada concentración de agente agregante puede calcularse a partir de un gráfico de absorbancia vs. concentración de nanopartículas, teniendo en cuenta que el valor de absorbancia disminuye con el agregado de las nanopartículas, puesto que durante el proceso se pierde la nanoestructura y por tanto se pierde el efecto del plasmón superficial. En resumen las curvas de agregación observadas presentan un comportamiento sigmoideo cuyos parámetros describen el proceso de agregación para una determinada nanopartícula, en determinadas condiciones de medida.

La tabla 2 muestra las relaciones entre los parámetros de la curva sigmoidea y las propiedades termodinámicas que surgen de la aplicación del modelo de MEL. Comparando ambas ecuaciones se concluye que el valor de concentración crítica donde el proceso de agregación se hace espontáneo, se corresponde con el punto de inflexión de la curva de Boltzmann. Por su parte, el coeficiente experimental m es inversamente proporcional al factor " d " el cual depende de la pendiente de la curva de Boltzmann en el punto de inflexión. En otras palabras, el significado físico del factor m es determinar qué tan abrupta será la variación de la absorbancia en el rango de transición entre la forma libre y agregada

de nanopartículas. Un valor grande de m supondrá un cambio precipitado entre los estados libres y agregados, mientras que valores pequeños determinaran cambios más graduales. Finalmente el valor de la energía libre de Gibbs en ausencia de agente incluye tanto el valor del punto crítico, como el parámetro " d ", lo cual refuerza el objetivo original, donde se plantea el cálculo de la energía libre como criterio unificador de todas las variables que afectan el proceso de agregación de las nanopartículas.

Tabla 2: Relaciones entre los parámetros sigmoideos y las propiedades termodinámicas. Adaptado de referencia ⁹⁷.

Parámetros del modelo	Parámetros de la Sigmoidea de Boltzmann
C_{FE}^{crit}	x_0
m	$\frac{RT}{d}$
$\Delta_{ag}G_{T,FE=0}^{AR}$	$\frac{x_0 RT}{d}$

$R=8.314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$, T representa la temperatura en K.

Los conceptos anteriormente descritos se esquematizan en la Figura 11, donde se observan que variaciones de x_0 se traducen en corrimientos de la curva hacia valores de concentraciones mayores de concentración de agente. Por otro lado, los cambios en el parámetro d , dan cuenta de qué tan abrupto se produce el proceso una vez que se alcanza cierta concentración de agente suficiente para lograr pasar a la región de transición del proceso. Por último, si se realizan cambios de ambas variables se observa la combinación lineal de ambos efectos en simultáneo.

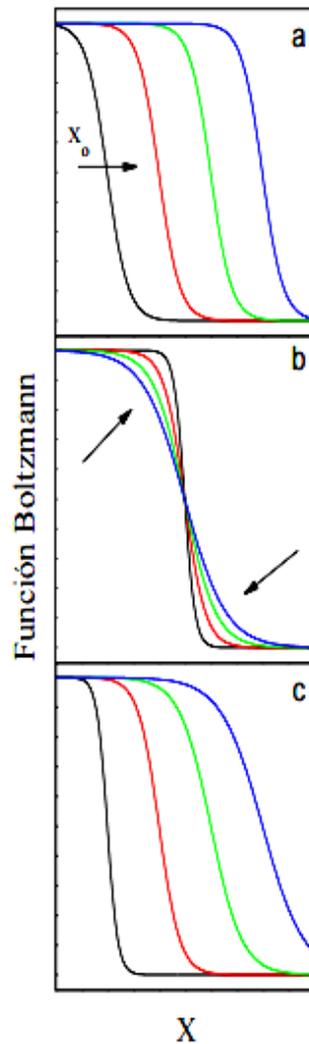


Figura 11: Efecto de los parámetros de la sigmoidea de Boltzmann: Aumento de x_0 manteniendo constante los demás parámetros (a), Aumento de d manteniendo x_0 y variaciones de ambos parámetros en simultáneo, manteniendo constante la relación x_0/d (c). Adaptado de referencia ⁹⁷.

Aplicación del modelo a muestras reales

El modelo anteriormente descrito permite entender y explicar los perfiles observados en el proceso de agregación de las nanopartículas. Para poder mostrar la puesta en práctica del modelo, se seleccionaron cuatro agentes de recubrimiento diferentes para las nanopartículas de plata, cubriendo los distintos tipos de interacciones posibles: el anión citrato (electroestática), el almidón (estérica), el sulfosuccinato de sodio NaAOT (electroestérica) y el ácido 2 thiobarbitúrico TBA (covalente). Las nanopartículas fueron expuestas a concentraciones crecientes de diferentes sales inorgánicas y la concentración de nanopartículas libres se siguió por espectroscopía UV-Vis-NIR a 400 nm. Todos los

experimentos se realizaron a temperatura ambiente. En todos los casos se observa que el proceso de agregación se ajusta al modelo descrito, observándose curvas sigmoideas que siguen la ecuación de Boltzmann, validando al mismo tiempo el modelo termodinámico propuesto.

Los perfiles de las curvas de agregación con NaAOT en presencia de diferentes sales de sodio mostraron curvas sigmoideas para todas los aniones empleados. Para el caso concreto del nitrato no se observa la primera etapa constante, indicando que la zona de transición comienza a muy bajas concentraciones de agente.

Por su parte los valores de $\Delta_{ag} G_{T,FE=0}^{AR}$ aumentan dependiendo de la naturaleza del electrolito empleado $Cl^- > Br^- > F^-$; siendo este orden inversamente proporcional a la relación carga/tamaño del halogenuro (Figura 12). El bromuro y el fluoruro inducen la agregación a menores concentraciones que el cloruro, aunque en el último caso la transición es más pronunciada, lo cual sugiere que una vez alcanzada cierta concentración el efecto del anión en la desestabilización del coloide es mucho más pronunciado que en los casos anteriores. Estos resultados indican que la estabilización electrostérica provista por el NaAOT es afectada por la naturaleza del electrolito, más que por un simple efecto de la fuerza iónica. Este efecto es tratado en mayor profundidad en capítulos posteriores, donde se observa un mecanismo diferencial de agregación por parte de este tipo de aniones que implica la formación de cloruro de plata sobre la superficie de la partícula. Esto genera que el proceso pueda dividirse en dos etapas, donde a bajas concentraciones se genera AgCl superficial, manteniéndose las nanopartículas separadas, y por tanto se observa una zona de meseta, luego al incrementar la concentración el cloruro la cantidad de cloruro de plata es suficiente para formar puentes entre las partículas, induciendo el agregado de forma abrupta.

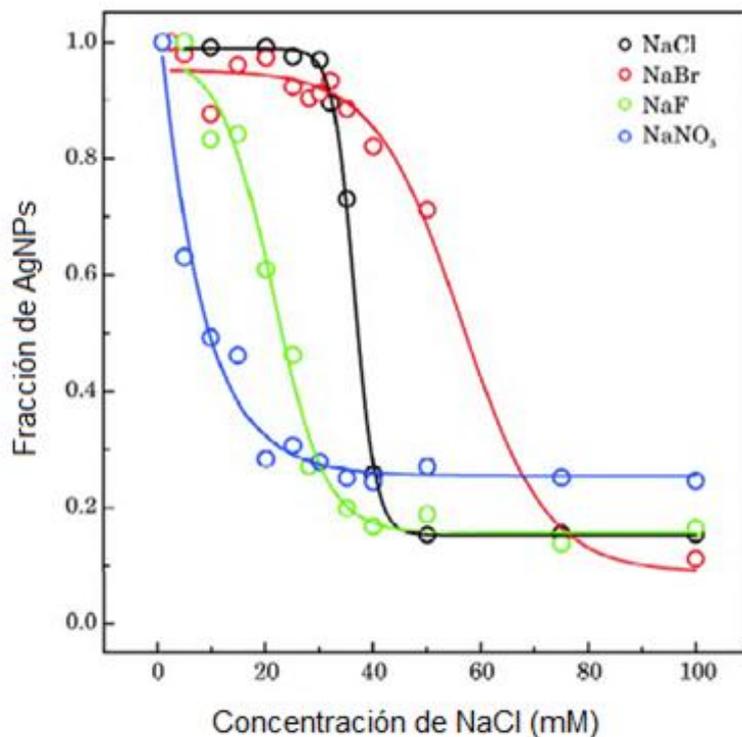


Figura 12: Gráfico comparativo del proceso de agregación de las nanopartículas, recubiertas de NaAOT, empleando diferentes sales. Adaptado de referencia ⁹⁷.

Junto con el efecto de la naturaleza del ion, es interesante observar la validez de modelo al cambiar el tipo de agente de recubrimiento empleado (Figura 13). Los perfiles de agregación muestran un comportamiento sigmoideo de tipo Boltzmann. Los valores de $\Delta_{ag} G_{T,FE=0}^{AR}$ incrementan en orden NaAOT>TBA>citrato de sodio>almidón (Tabla 2). Los resultados sugieren que existe una dependencia entre el poder estabilizante del agente y el mecanismo requerido. El NaAOT y el TBA presentan los valores mayores de $\Delta_{ag} G_{T,FE=0}^{AR}$ siendo comparativamente similares, dado que ambos tienen un fuerte poder estabilizante, siendo el primero electroestérico (estabiliza por dos mecanismos) y el segundo por formación de enlaces covalentes, entre el tiol y la plata. Por su parte el citrato se ubica en tercer lugar, dado que la protección es únicamente de la forma electroestática. Finalmente el almidón que presenta una protección de tipo estérica posee energías de Gibbs más bajas. Asimismo es relevante destacar que el TBA cuyo efecto de protección es covalente tiene una zona de meseta más pronunciada que el resto de los agentes protectores, o dicho de otra forma presenta un x_0 a valores mayores de concentración de agente. Esto refleja también el

carácter covalente del mecanismo de protección, aumentando la concentración crítica que puede soportar el sistema en presencia de cloruro de plata. Este efecto se atribuye a una competencia entre los tioles y los cloruros por interactuar con la superficie de la nanopartícula. Los resultados sugieren que el TBA solamente es capaz de cubrir una fracción de la superficie de la nanopartícula, dejando lugar a huecos por donde el cloruro puede absorberse y formar AgCl , determinando la agregación una vez alcanzada cierta concentración crítica de Cl^- (Figura 13).

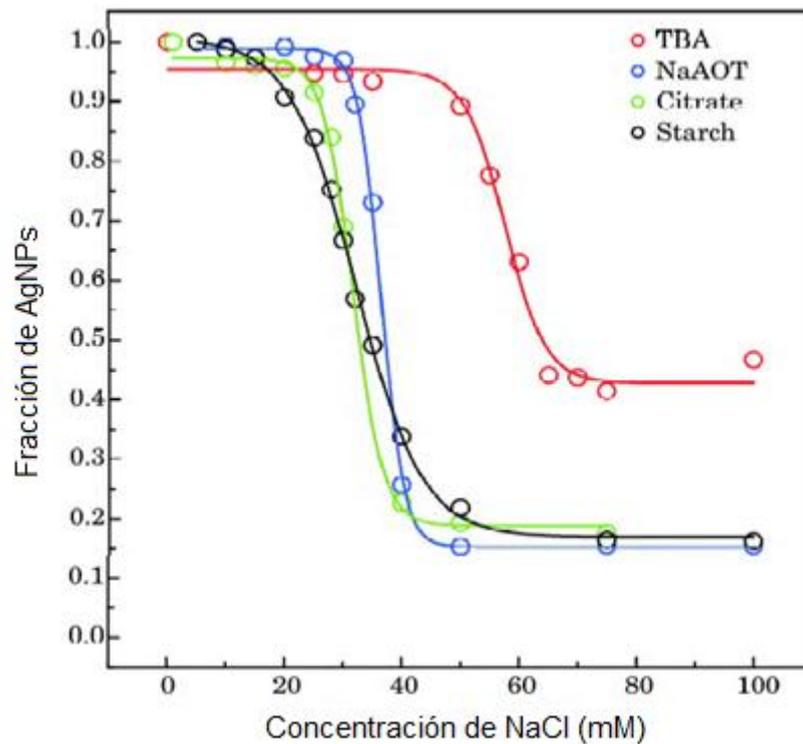


Figura 13: Ensayos de agregación sobre nanopartículas recubiertas con diferentes agentes de recubrimiento, en presencia de concentración es de NaCl en el rango de 1-100 mM. Adaptado de referencia ⁹⁷.

Tabla 2: Cálculo de las propiedades termodinámicas a partir del modelo propuesto para la evaluación de la estabilidad. Adaptado de referencia ⁹⁷.

Agente de recubrimiento	Parámetros de la función de Boltzmann	Parámetros calculados siguiendo el modelo de agregación de nanopartículas
Acido 2-tiobarbitúrico (TBA)	$A_1 = 0.95 \pm 0.02$ $A_2 = 0.43 \pm 0.02$ $x_0 = 57.5 \pm 0.8$ $d = 3.4 \pm 0.7$	$\Delta_{ag} G_{T,FE=0}^{AR} = 41.9 kJ mol^{-1}$ $m = 729$
Sulfosuccinato de sodio (NaAOT)	$A_1 = 0.989 \pm 0.005$ $A_1 = 0.152 \pm 0.006$ $x_0 = 36.4 \pm 0.1$ $d = 1.9 \pm 0.1$	$\Delta_{ag} G_{T,FE=0}^{AR} = 47.4 kJ mol^{-1}$ $m = 1304$
Citrato de sodio	$A_1 = 0.97 \pm 0.01$ $A_1 = 0.19 \pm 0.01$ $x_0 = 31.6 \pm 0.4$ $d = 2.6 \pm 0.3$	$\Delta_{ag} G_{T,FE=0}^{AR} = 30.1 kJ mol^{-1}$ $m = 953$
Almidón	$A_1 = 1.00 \pm 0.01$ $A_1 = 0.17 \pm 0.01$ $x_0 = 32.1 \pm 0.3$ $d = 5.6 \pm 0.3$	$\Delta_{ag} G_{T,FE=0}^{AR} = 14.2 kJ mol^{-1}$ $m = 442$

Utilidad del modelo en el desarrollo de sensores colorimétricos

El modelo termodinámico propuesto, conjuntamente con el método de extrapolación de MEL, es útil a la hora de estudiar y determinar el mejor agente a ser empleado para el desarrollo de sensores colorimétricos. La primera porción de la curva, mientras no se observa disminución en los valores de absorbancia, es útil para determinar la concentración máxima de agente que puede coexistir con las nanopartículas libres. Desde el punto de vista de un sensor colorimétrico estos valores están asociados a la robustez del sensor, es definiendo el límite máximo de interferencia que puede soportar antes de dar un falso positivo. Por otro lado, la pendiente determinada por el parámetro d , da cuenta de la sensibilidad del sensor. A modo de ejemplo, si se buscara un sensor positivo negativo de determinado agente capaz de agregar las nanopartículas, es deseable que la etapa de

transición sea lo más abrupta posible, de manera de trabajar sobre un valor umbral de concentración, para el cual una variación bien pequeña genera una desestabilización completa del sistema permitiendo la identificación de variaciones pequeñas en las concentraciones.

Por último los valores de energía libre en ausencia de agente permiten estimar el mejor agente de recubrimiento a ser empleado para el almacenamiento de las nanopartículas en solución.

Es relevante mencionar que en ningún caso se observa agregación a pH 14 (Figura 14). La explicación de este resultado se atribuye a la competencia entre los iones cloruros y los grupos hidroxilo, los cuales son capaces de generar una pequeña película de Ag_2O superficial que impediría la agregación¹⁸³.

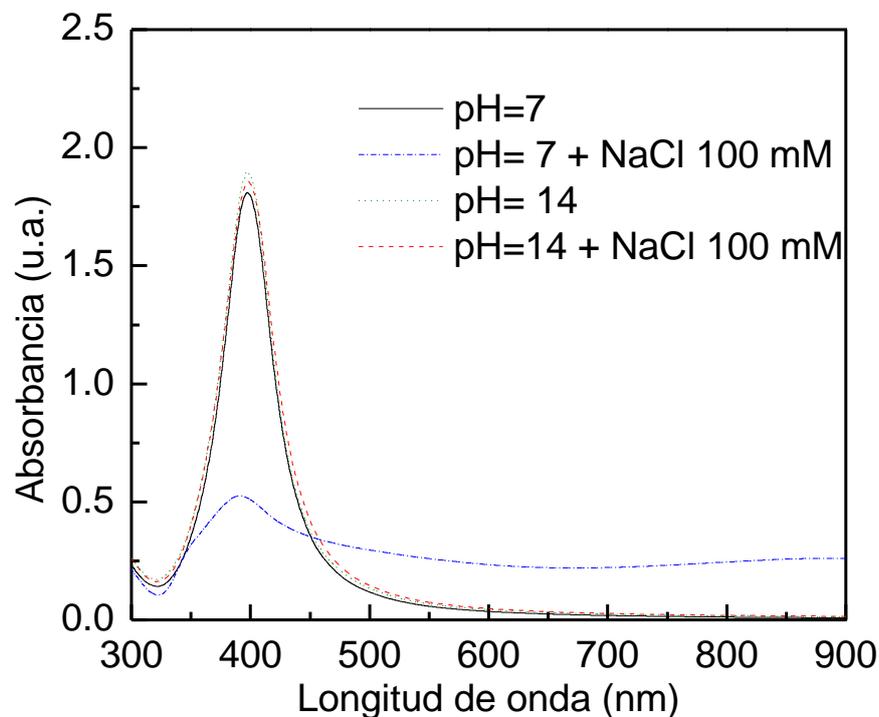


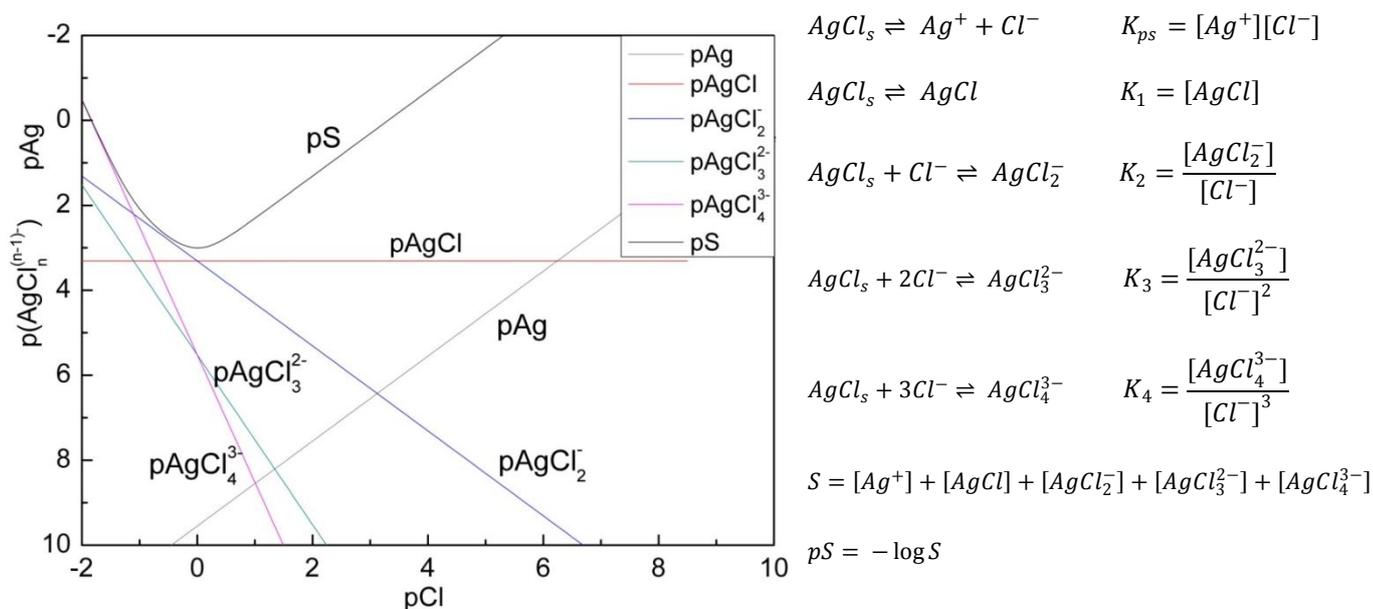
Figura 14: Espectros UV-Vis-NIR de las AgNPs recubiertas con almidón a pH 7 (negro), pH 7 y 100 mM NaCl (azul), pH 14 (verde), pH 14 y 100 mM NaCl (rojo). Adaptado de referencia¹⁰².

De acuerdo con la bibliografía consultada, las AgNPs en solución acuosa son factibles de agregarse frente a la presencia de iones, debido al aumento de la fuerza iónica como por reacciones químicas sobre la superficie de la nanopartícula¹⁸⁴. Este último caso fue reportado inicialmente por Jiang y Yu ¹⁸⁴ quienes se observaron un comportamiento diferencial de los espectros UV-Vis de nanopartículas planas frente a la presencia de distintos halogenuros. Esta diferencia es atribuida a la capacidad de ciertos halogenuros (cloruro, yoduro, bromuro) de reaccionar con la plata formando sales insolubles alrededor de la nanopartícula, generando como resultando un cambio en el plasmón y por tanto un cambio en el espectro.

Como se mencionaba en el capítulo II, si bien existían varios experimentos que constataban las diferencias entre los distintos halogenuros, la evidencia de formación de sales insolubles era hasta entonces escasa, e incluso confusa, para los casos donde la presencia de Cl^- a bajas concentraciones podía incluso aumentar la estabilidad de las nanopartícula recubiertas con polivinilpirrolidona (PVP) ²². En este contexto se planteó el desafío de poder explicar cuál era el efecto real que tenían los cloruros sobre las nanopartículas de plata, buscando la forma de presentar un mecanismo global que explicara todos los resultados experimentales.

Como se había mencionado anteriormente, los espectros UV-Vis-NIR de las nanopartículas recubiertas de almidón (Figura 10 a y c) mostraban una reducción en la absorbancia a 400 nm concomitantemente con el incremento de la absorbancia a 800 nm frente el agregado de concentraciones crecientes de NaCl y NaBr, respectivamente. Las imágenes por microscopía electrónica de transmisión (TEM) confirman los resultados espectroscópicos (Figura. 16), donde se observa que en presencia de NaCl se forma una capa AgCl y/o AgCl_2^- que recubre a todas las partículas, las cuales lógicamente también se encuentran reducidas en tamaño debido a la reacción con los Cl^- . La estructura de estos agregados pueden variar dependiendo de la especie química que prevalece en solución entre el AgCl y el AgCl_2^- dado que ambos presentan una geometría molecular diferente. Para el caso en que la especie mayoritaria sea el AgCl_2^- los agregados forman estructuras orientadas de forma lineal ^{59,106,107}, mientras que para el caso donde predomine el AgCl, se forman agregados en todas direcciones, que en una segunda etapa pueden terminar precipitando el coloide debido al bajo valor del Kps del AgCl (1.77×10^{-10}) ¹⁸⁵.

Retomando los resultados de El-Badawy et al. ²², ahora es posible explicar por qué a bajas concentraciones, existe un efecto estabilizante de las nanopartículas: De acuerdo con la Figura 15 a bajas concentraciones de cloruros existe una mayor concentración de $AgCl_2^-$, conjuntamente con un mínimo en la solubilidad de la plata, lo cual sugiere que en estas condiciones se forma la primera fase, con el recubrimiento de las partículas con cloruros sin llegar a formar agregados. Esto explica que las nanopartículas recubiertas con PVP logren aumentar su estabilidad frente a la fuerza iónica, dado que los $AgCl_2^-$ que se encuentran en la vecindad de la superficie, contribuirían a estabilizar electrostáticamente al coloide. Si por el contrario la concentración de cloruros es mayor, la especie predominante es el $AgCl$ y por tanto, se empezarían a formar los agregados de las partículas.



Temperatura / °C	$AgCl$ pK_{ps}	$AgCl_{ac}$ pK_1	$AgCl_2^-$ pK_{ps}	$AgCl_3^{2-}$ pK_{ps}	$AgCl_4^{3-}$ pK_{ps}
25	9.55	3.31	5.52	5.52	5.51

Figura 15: Diagrama de los complejos clorurados. S representa la solubilidad de plata: El diagrama fue diseñado en base a los datos reportados por Z. Q. Zhong, G. G. Mei *Application of diagrams of chemical potential in hydrometallurgy and purification of waste water*. Changsha: Central South University of Technology Press, 1986. (in chinese).

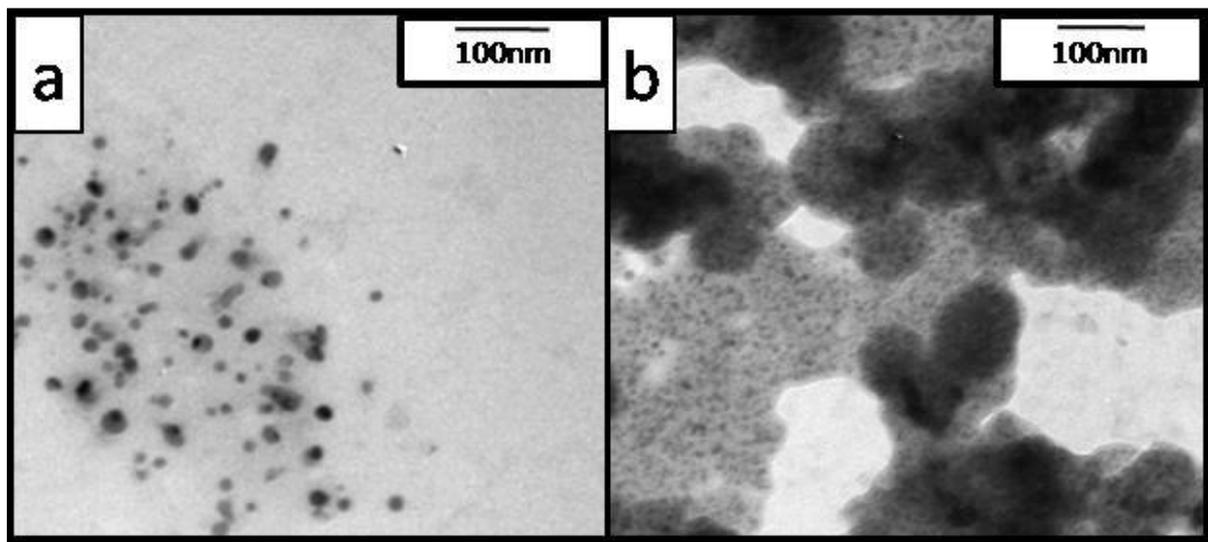


Figura 16: Imágenes TEM de las AgNPs recubiertas de almidón en ausencia de NaCl **(a)** y en presencia de 100 mM NaCl **(b)**. Adaptado de referencia ¹⁰².

El análisis por difracción de rayos X (Figura 17) evidencia la formación de cloruro de plata cristalino (AgCl) sobre las nanopartículas de acuerdo con las presencias simultáneas de los máximos a 27.9° y 32.3° que corresponden con las señales de los planos cristalinos (111) y (200) de la celda cúbica centrada en las caras del AgCl (JCPDS 31-1238). Adicionalmente los picos a 38.3° , 44.5° y 64.8° se asignan a los planos (111), (200) y (220) de una celda cúbica centrada en las caras correspondiente a la plata metálica (JCPDS4-0783)^{186,187}. Por su parte el máximo a 31.8° es asignado al plano (200) del cloruro de sodio el cual fue utilizado para inducir la agregación.

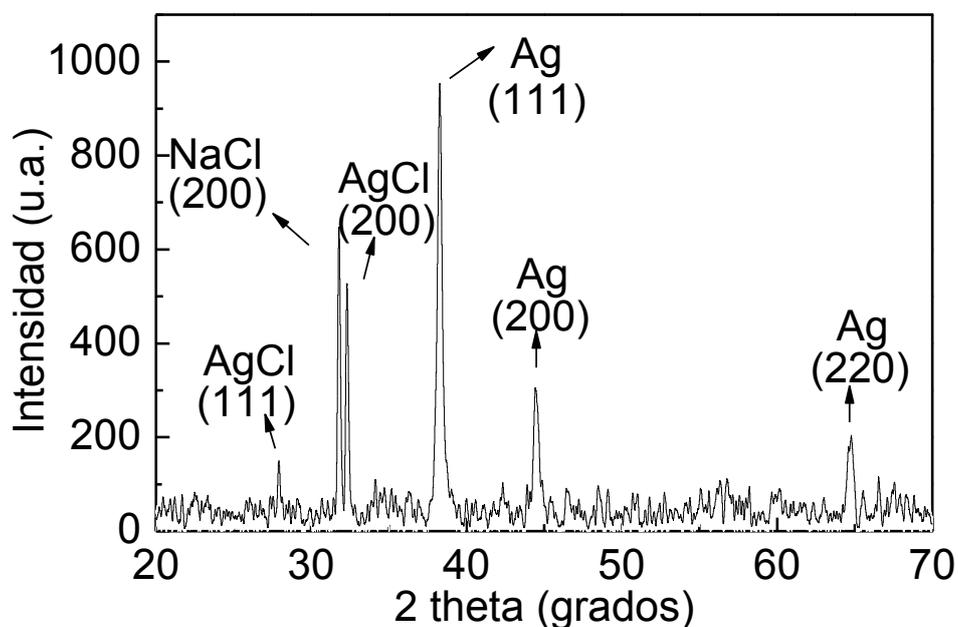


Figura 17: XRD de las AgNPs recubiertas de almidón agregadas mediante 100 mM NaCl. Adaptado de referencia ¹⁰².

El tamaño promedio de las cristalitas de Ag(0) y AgCl estimados por el método de Debye-Scherrer es de 5 y 8 nm, respectivamente. La reducción en el tamaño de las AgNPs sugiere la disolución de las mismas generada por la formación de AgCl.

Para estudiar el efecto químico de los cloruros sobre las nanopartículas de plata, las mismas fueron depositadas sobre un electrodo de grafito e incubadas en una solución 1 M de NaCl. El perfil voltamperométrico de 0 a -0.25 V mostró una contribución catódica a -0.11 V (Figura 18a) la cual es asignada a la reducción del AgCl a Ag(0).

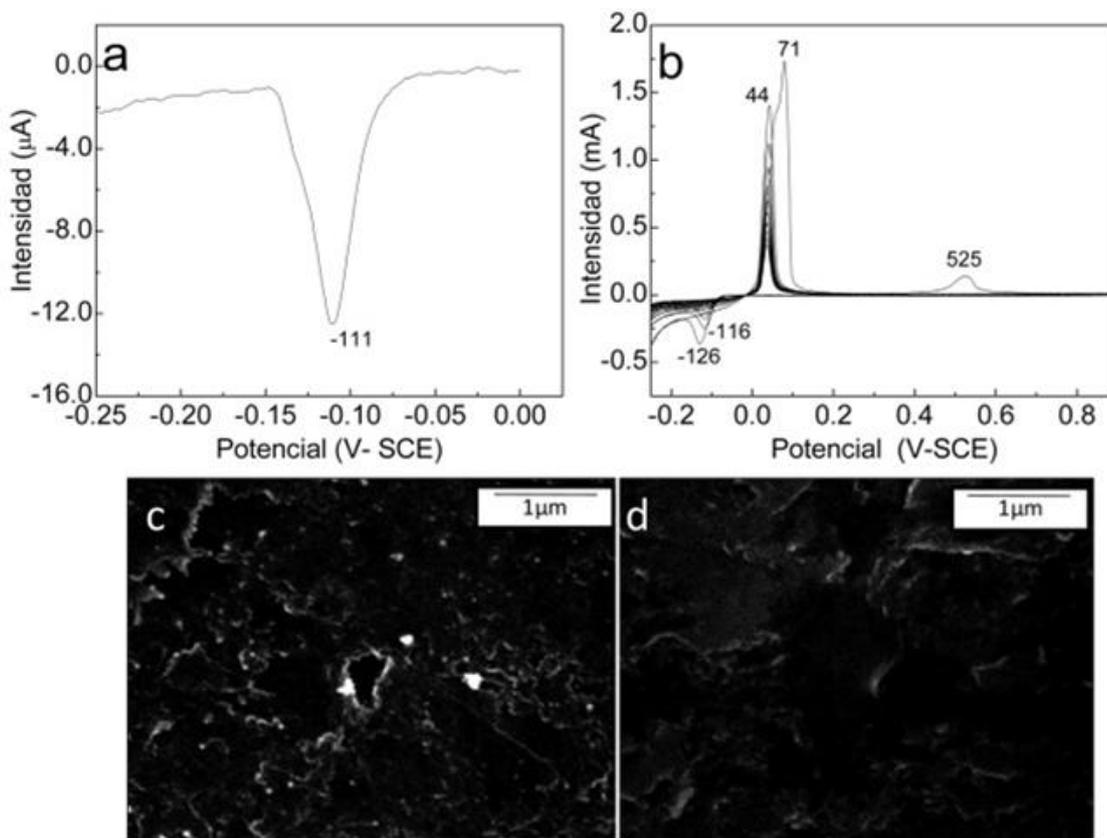
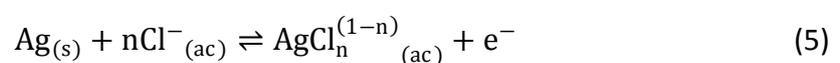


Figura 18: Perfiles voltamperométricos a una velocidad de barrido de 0.1 V s^{-1} de las nanopartículas depositadas sobre electrodos de grafito. Barrido desde 0 a -0.25 V (a). Barrido positivo de 0 a 0.9 V (b). Imágenes TEM de los electrodos de grafito en presencia (c) y ausencia (d) de los depósitos de nanopartículas. Adaptado de referencia ¹⁰².

Por otro lado el perfil voltamperométrico para el barrido positivo de 0 V a 0.9 V (Figura 18b) mostró dos procesos anódicos, ambos asignados a la disolución de nanopartículas de plata. El primer pico puede dividirse en tres contribuciones (Figura 19): la primera corresponde al AgCl cristalino, mientras que las otras dos restantes corresponden a los compuestos de cloruro de fórmula general $\text{AgCl}_n^{(1-n)}$ ^{188,189} proveniente de la oxidación de las nanopartículas de plata pasando a Ag(I) , de acuerdo con la ecuación:



Los anchos medio de pico calculados para las curvas deconvolucionadas de la contribución anódica son menores al valor esperado para reacciones redox de especies adsorbidas y se encuentran en línea con el comportamiento voltamperométrico observado en películas delgadas ⁴⁶. Esto último refuerza la idea original de formación de cloruro de plata sobre la superficie de la nanopartícula ¹⁹⁰.

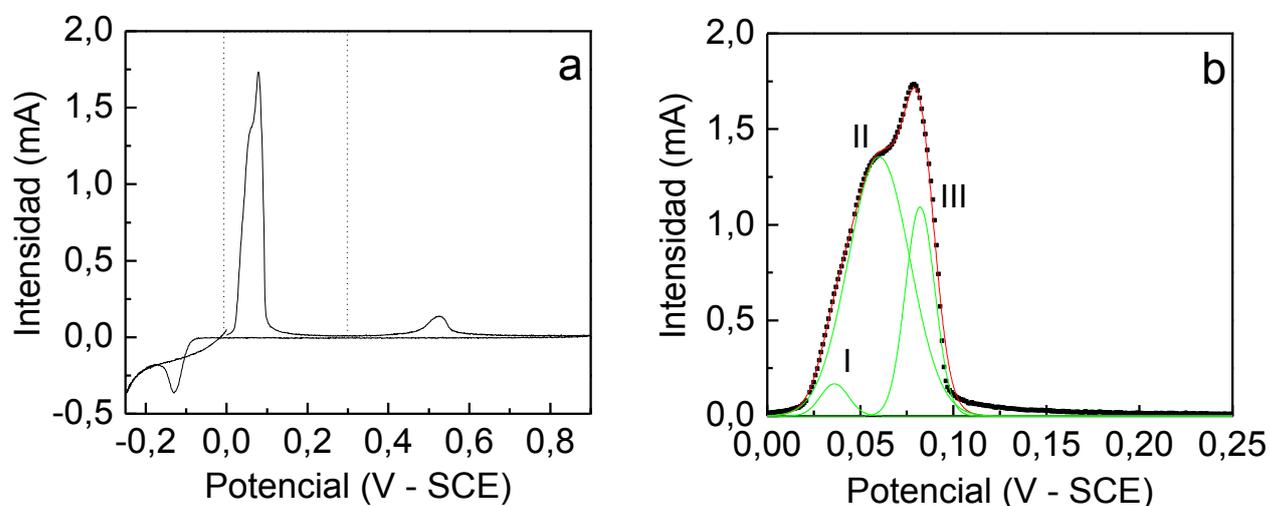


Figura 19: Primer ciclo de 0 a 0.1 V s⁻¹ **(a)** y su correspondiente magnificación entre 0 y 0.25 V, incluyendo la deconvolución del pico en 3 contribuciones asignadas a los diferentes compuestos clorurados: I a 0.036 V, II a 0.060 V, y III a 0.082 V **(b)**. Adaptado de referencia ¹⁰².

Entre los diferentes compuestos de cloruro de plata, se observó la formación de AgCl (n=1) (II), y AgCl₂⁻ (n=2) (III), de acuerdo con el diagrama de especiación para una concentración 1 M de NaCl (Figura 15). Adicionalmente el AgCl puede también existir formando el complejo AgCl(H₂O)₂ ¹⁸⁸. En consecuencia, es esperable una pequeña diferencia en los potenciales, hecho que se constata en la Figura 19b.

El segundo proceso observado aparece a 0.53 V, el cual se atribuye a la disolución de la nanopartícula a Ag (I), de acuerdo con la ecuación:



En este caso el ancho medio de pico aparece a ca. 60 mV, valor esperable para un proceso redox irreversible de especies adsorbidas⁴⁶ (Capítulo I).

Finalmente, el barrido negativo mostró una contribución catódica a -0.13 V correspondiente a la reducción del AgCl formado electroquímicamente, completando de esta manera el ciclo.

Aún utilizando un agente protector eficiente como el almidón, las nanopartículas de plata son susceptibles a la agregación por un mecanismo independiente de la fuerza iónica. La diferencia radica en la formación de sales insolubles alrededor de las nanopartículas que generan agregados. La forma de estos últimos dependerá de la prevalencia en la formación de AgCl_2^- ¹⁸⁸ y/o AgCl. En el primer caso los agregados adoptan una estructura en forma de cadena^{106,107}, mientras que en el segundo se genera un arreglo aleatorio, como en nuestro caso (Figura 16b).

7.3 Conclusiones

En resumen, las nanopartículas recubiertas de almidón sintetizadas con un tamaño promedio entre 10-20 nm de diámetro, mostraron un mecanismo de agregación diferencial frente al agregado de partículas al variar la naturaleza química de la sal empleada. Los halogenuros con un bajo valor de K_{ps} , en especial el NaCl que se encuentra de forma ubicua en el medio ambiente, induce la agregación de las partículas a través de la formación de una capa superficial de los compuestos de $AgCl$ y/o $AgCl_n^{1-n}$. Este efecto puede ser inhibido a pH básicos.

Para estudiar el proceso de agregación se propone un modelo termodinámico que toma en cuenta solamente dos estados posibles, el estado de nanopartículas libres y el agregadas, permitiendo acumular todas las variables responsables del proceso de agregación de las partículas en los parámetros simples que definen la ecuación sigmoidea del proceso. El modelo permite la interpretación de los resultados experimentales incluyendo las interacciones que existen entre las nanopartículas de plata y los cloruros, así como también los diferentes perfiles que se observan al variar la naturaleza química del agente protector. Asimismo permite el cálculo de la energía de Gibbs asociada al proceso de agregación de las partículas, que describe globalmente el sistema incluyendo todos los factores intrínsecos y extrínsecos del proceso de agregación.

Capítulo VIII: Hacia un sensor colorimétrico del mercurio

En capítulos anteriores se subrayaba la importancia del estudio de la estabilidad y la caracterización de las nanopartículas de plata para sentar las bases necesarias para estudiar su viabilidad como sensores de mercurio. Recapitulando el tema del funcionamiento de los sensores colorimétricos de mercurio, como se mencionaba anteriormente, la estrategia de la amalgama es dentro de las reportadas, una de las menos exploradas en cuanto a que la gran mayoría de los sensores reportados, se centran en las interacciones T-Hg^{II}-T, dejando de lado la gran capacidad que tiene la plata de amalgamar de forma selectiva al mercurio.

El presente capítulo emplea los conocimientos anteriormente adquiridos en el estudio de la viabilidad de un sensor colorimétrico del mercurio con nanopartículas de plata, haciéndose énfasis en las capacidades y las limitaciones que posee la estrategia de amalgamación. El capítulo finaliza con las conclusiones generales de todo el eje temático de la Tesis, junto con una mirada crítica a las perspectivas futuras que surgen a partir de la presente Tesis.

8.1 Materiales y Métodos

Todos los reactivos fueron utilizados en grado analítico y todas las disoluciones empleadas se prepararon con agua ultrapura (resistividad < 18.2 MΩ cm).

Nitrato de plata (AgNO₃, 99%, Biopack), ácido sulfúrico (H₂SO₄, 95-98%, Biopack) ácido nítrico (HNO₃, 69.0-71.0% Biopack) cloruro de sodio (NaCl, 99% Anedra) hidróxido de sodio NaOH Cicarely, borohidruro de sodio (NaOH, 98%, Sigma). Almidón soluble (pureza analítica, Mallinckrodt), estándar de mercurio 1000 mg/L en 12% de ácido nítrico de alta pureza para ICP (Sigma-Aldrich). Nitrato de hierro (FeN₂O₉·9H₂O, pureza analítica, AppliChem). Nitrato de Zinc (Zn(NO₃)₂ ·6H₂O,99%,AppliChem). Nitrato de cromo (CrN₃O₉ · 9H₂O , 99.99% Sigma-Aldrich). Nitrato de cadmio (CdN₂O₆·4H₂O, ≥99.0%, Sigma-Aldrich). Nitrato de bismuto (BiN₃O₉ · 5H₂O, ≥ 98.0%, Fluka). Sulfato de cobre (CuSO₄ · 5H₂O, 99%, Merck). Papel de filtro con tamaño de poro de 110 mm (Macherey-Nagel), Filtros para DLS

de 0.22 μ de tamaño de poro (MFS™), tubos "falcon" de polipropileno, electrodos de vidrio recubiertos con óxido de indio estaño (ITO, $\text{In}_2\text{O}_3/\text{SnO}_2$ Sigma-Aldrich).

Previo a los ensayos de síntesis de nanopartículas, la pureza del borohidruro de sodio fue previamente evaluada de acuerdo al protocolo descrito en el capítulo III ⁶⁹.

Limpieza del material de vidrio

Todo el material de vidrio fue lavado empleando una mezcla de H_2SO_4 y HNO_3 concentrado en relación 1:1 (v/v), para eliminar cualquier contenido de plata presente, y luego se realizaron enjuagados exhaustivos con abundante agua ultrapura (resistividad > 18.2 $\text{M}\Omega$ cm).

Voltamperometría de *stripping* anódico

Las voltamperometrías se realizaron empleando un electrodo de carbono vítreo, un electrodo de Ag/AgCl y un electrodo de platino como electrodo de trabajo, de referencia y auxiliar respectivamente. Se realizaron barridos anódicos entre -0.3 a 0.9 V, a una velocidad de 0.1 Vs^{-1} empleando un electrolito soporte de NaNO_3 1M, un tiempo de deposición de 5 min y una concentración de 1 mM de Ag y Hg para cada uno de los correspondientes estudios.

Voltamperometría cíclica

Las voltamperometrías se realizaron empleando un electrodo de carbono vítreo, un electrodo de Ag/AgCl y un electrodo de platino como electrodo de trabajo, de referencia y auxiliar respectivamente. Se realizaron corridas entre -0.4 a 0.9 V, a una velocidad de 0.05 Vs^{-1} , partiendo de un potencial -0.4 V empleando un electrolito soporte de NaNO_3 1 M y una concentración de 1 mM de Ag^+ y Hg^{2+} para cada uno de los correspondientes estudios.

Estudios para la detección de mercurio

La detección de mercurio se siguió por espectrofotometría UV-Vis en el rango de 300 a 900 nm mediante registrándose los corrimientos y en los cambios de absorbancia de la banda máxima del plasmón de las nanopartículas a (ca. 400nm), observados tras el agregado de concentraciones crecientes de mercurio. Paralelamente se realizaron ensayos con concentraciones constantes de mercurio(II) a $5 \times 10^{-6}\text{M}$ agregándose volúmenes crecientes

de la solución de síntesis de las nanopartículas de plata, para estudiar el efecto que tienen los cambios de relación plata mercurio sobre el plasmón de las nanopartículas.

Estudios de interferencia con otros metales

Para estudiar la incidencia que tienen otros metales sobre el espectro del plasmón de las nanopartículas, se emplearon algunas de las sales más comúnmente encontradas en ambientes acuosos como el Zn, Fe, Cr, Cu y otras con similar reactividad al mercurio como el Cd, Bi y la propia Ag. En todos los casos se realizaron adiciones progresivas de 5 a 50 μL de nanopartículas de plata sobre una disolución 1×10^{-3} M de cada sal respectiva.

Inmovilización de nanopartículas sobre superficies sólidas

Los ensayos se realizaron sobre diferentes soportes, papel de filtro, electrodos de vidrio recubiertos con ITO y sobre tubos "Falcon" de 15 mL de polipropileno. Los recubrimientos se realizaron por deposición física de las nanopartículas, incubando el material con la solución de nanopartículas durante 24 hs. Luego de este tiempo se realizaron al menos tres lavados con agua ultrapura, para corroborar la correcta deposición de las partículas.

Medidas de tamaño por DLS

Se midió el diámetro hidrodinámico medio efectivo con el método de cumulantes de las nanopartículas de plata recubiertas de almidón frente al agregado de concentraciones crecientes de mercurio empleando una dilución 1/3 disolución de síntesis, registrando 5 medidas de tamaños en ciclos de 5 min cada uno. Se mantuvo una temperatura constante a 25°C y se dejó un tiempo de estabilización de 10 min antes de comenzar a realizar las medidas. Previo al análisis, las disoluciones de nanopartículas, así como también las disoluciones de mercurio y el agua necesaria para el lavado del material fueron filtradas con un filtro de $0.22 \mu\text{m}$ de tamaño de poro promedio.

Detección de mercurio en nanopartículas recubiertas con almidón y TBA

A partir de $500 \mu\text{L}$ de nanopartículas recubiertas de almidón, se agregaron $10 \mu\text{L}$ de una disolución de TBA 10^{-4} M agitando vigorosamente durante 15 min, luego se agregaron $500 \mu\text{L}$

una solución de NaCl 100 mM. Finalmente se agregaron 500 μL con concentraciones crecientes de mercurio para observar el efecto del mismo en el sistema.

8.2 Resultados y Discusión

La reacción entre la plata y el mercurio es un proceso relativamente rápido tomando en cuenta que el método se usaba desde antaño para la extracción de plata de las minas. Este efecto se pone de manifiesto en el seguimiento de la absorbancia a 400 nm con el tiempo para una solución de nanopartículas a la cual se agrega una concentración de mercurio de $1 \times 10^{-7} \text{M}$. En este caso se observa que se alcanza una meseta a los 12 min de reacción, lo cual marca el mínimo tiempo de reacción necesario para llegar al equilibrio (Figura 1).

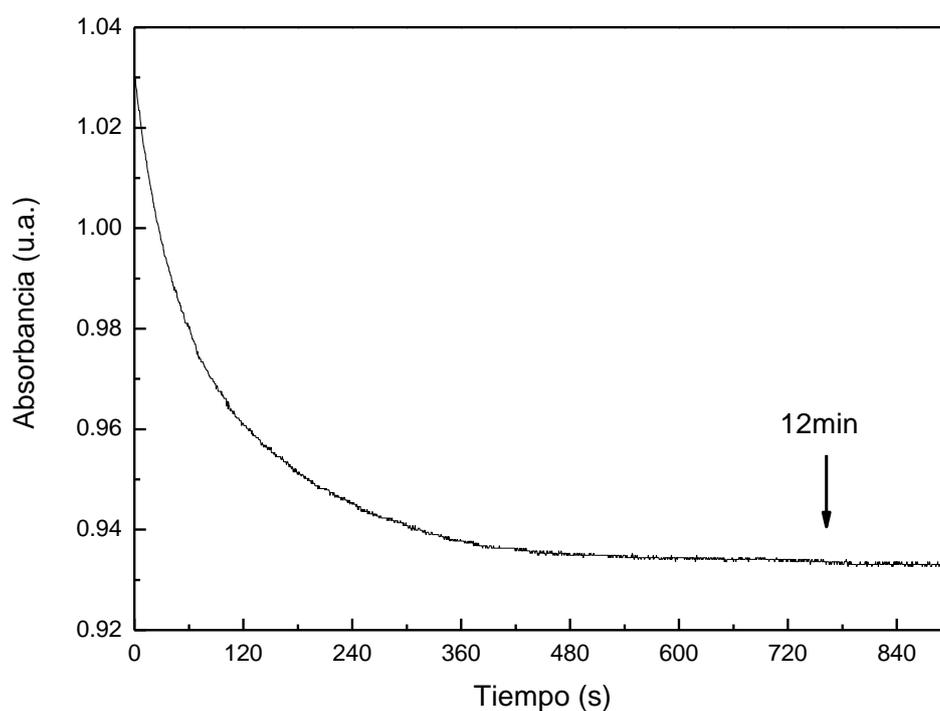


Figura 1: Tiempo de reacción entre la nanopartícula de plata y una solución de mercurio (II) $1 \times 10^{-7} \text{M}$. El gráfico muestra como se estabiliza la absorbancia, medida a 400 nm, a los 12 min.

Una de los puntos claves en la estrategia de amalgamación consiste en explotar la cercanía en los potenciales redox entre la plata y el mercurio. Para explorar esta hipótesis, se realizaron experiencias de voltamperometría de *stripping* anódico (Figura 2) en disoluciones de mercurio y plata observándose la estrecha relación en los valores de los potenciales de oxidación de ambas especies, observándose incluso un corrimiento de ca. 0.1 V en el pico de

mercurio cuando se forma la amalgama, lo cual confirma la posibilidad, que tienen las nanopartículas de plata de generar la reducción espontánea del mercurio mediante la oxidación de los átomos de plata ubicados sobre la superficie de la nanopartícula, dada la cercanía en sus potenciales redox (Capítulo VI).

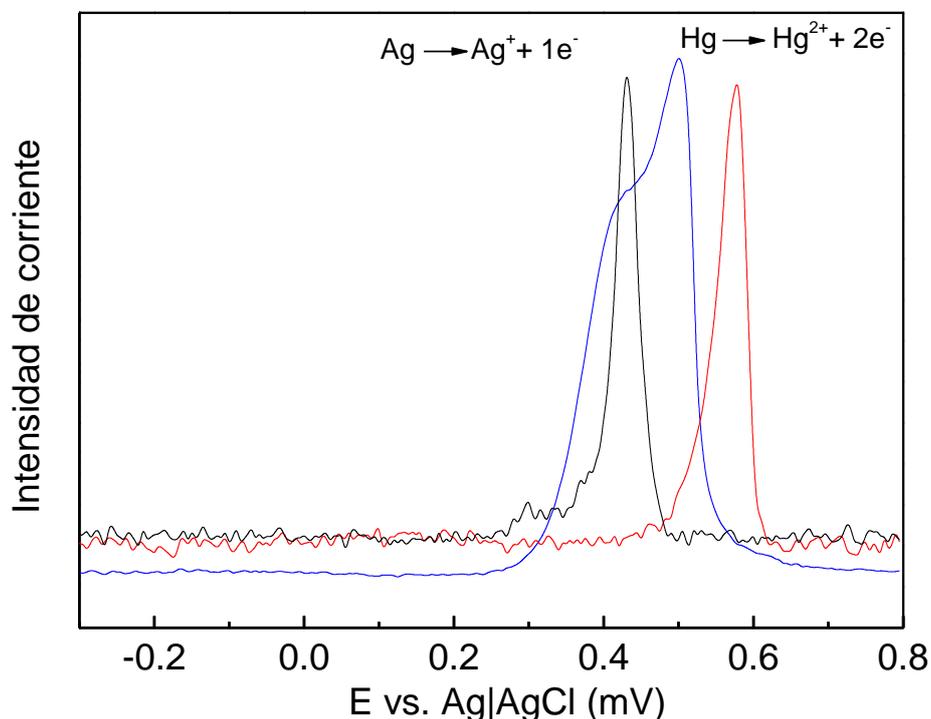


Figura 2: Voltamperometría de *stripping* anódico, sobre carbono vítreo en una disolución 1M de nitrato de sodio. La figura muestra la cercanía de los potenciales de oxidación del mercurio (rojo) y la plata (negro). El corrimiento del pico de mercurio cuando se encuentran conjuntamente ambas sales son evidencias de la formación de la amalgama (azul).

Similares resultados se observan sobre las voltamperometría cíclicas, donde la presencia de nanopartículas en solución generan la aparición de un pico a un valor muy cercano al correspondiente potencial de oxidación de la plata (0.35 V) (Figura 3). Sin embargo en presencia de mercurio (II) se observa el corrimiento de las señales, observándose dos picos a 0.49 y 0.61 V los cuales se adjudican a la oxidación de la malgama de mercurio-plata. Por su parte el pico de reducción observado a 0.12 V se debe a la formación de la amalgama por la reducción de ambos metales.

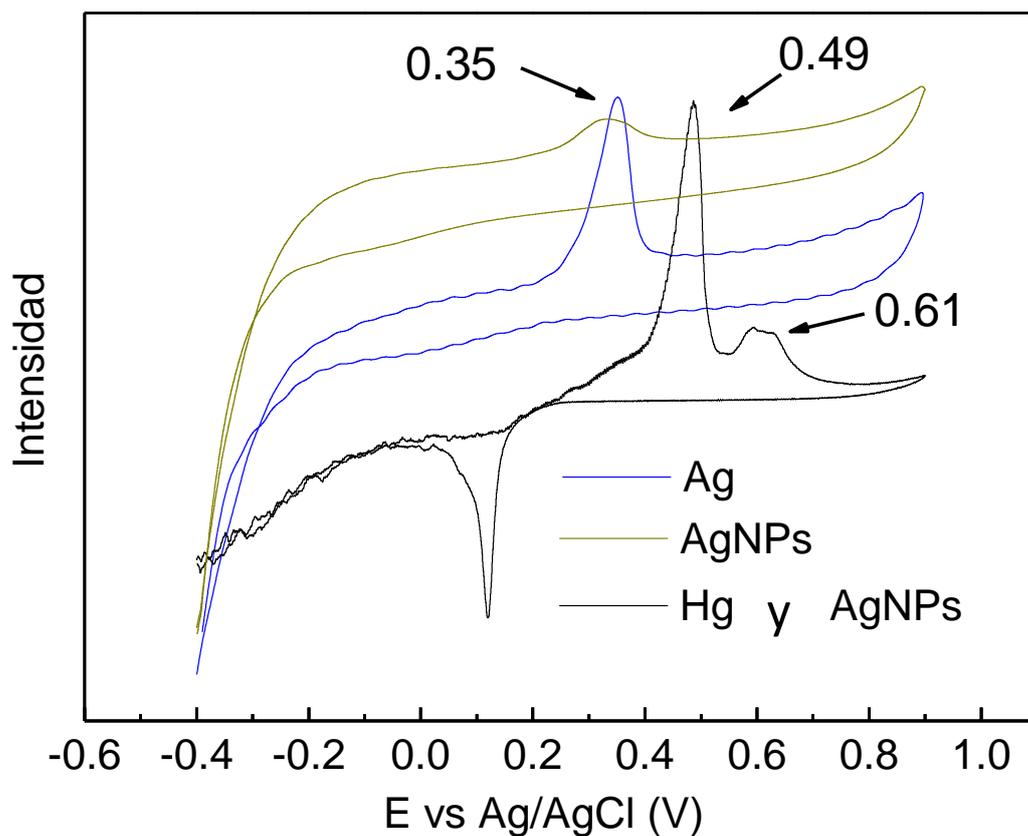


Figura 3: Voltamperometrías de las nanopartículas en presencia de mercurio. La figura muestra por un lado el solapamiento de las señales del pico correspondiente a la oxidación de la plata y cómo en presencia de mercurio se observa el corrimiento de la señal de oxidación de que evidencian la formación de la amalgama entre la nanopartícula y el mercurio. Además se observa el pico catódico el cual corresponde a la electrodeposición del mercurio sobre la plata reducida por la aplicación de un potencial. Barrido a 50 mV s^{-1} .

Es claro que la formación de amalgama es un proceso que debería cambiar el tamaño de las nanopartículas, reflejándose este efecto sobre el plasmón superficial, lo que daría la respuesta colorimétrica buscada del sensor. Sin embargo previo a realizar estos análisis es interesante explorar de qué forma se manifiestan estos cambios, determinando si se trata de un fenómeno exclusivamente de superficie o sí por el contrario el mercurio tiene un efecto de agregación sobre las nanopartículas. Para dar respuesta a estas interrogantes se realizaron medidas de DLS sobre nanopartículas estabilizadas con almidón, a diferentes concentraciones de mercurio en solución.

Al aumentar la concentración de nitrato de mercurio se observa que los diámetros hidrodinámicos de las partículas crecen de forma notoria (con una diferencia en el tamaño

promedio de al menos 2 nm) a partir de concentraciones superiores a 5×10^{-6} M de $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ (Figura 4). Por debajo de este valor también existe una tendencia en aumento, pero los valores promedios se encuentran dentro del margen de error de las medidas del equipo (Figura 4 b). Estos resultados están en concordancia con los efectos observados en el espectro UV-Vis de las nanopartículas de plata en presencia de mercurio en donde los cambios en el corrimiento de la banda máxima del plasmón, estaría vinculado con variaciones en el radio hidrodinámico de las partículas. El mercurio presente en solución es capaz de ser captado por las nanopartículas de plata formando una amalgama que se refleja en el aumento del radio de las partículas. Por debajo de una concentración de 4×10^{-4} M se observa un aumento lineal entre la cantidad de plata formada y el mercurio presente en solución, mientras que a partir de este valor, se observa un aumento exponencial en el radio hidrodinámico de las partículas. Esto se explica si se toma en cuenta el cálculo aproximado de la cantidad de átomos de mercurio capaz de ser amalgamados por una partícula de plata, asumiendo que la absorptividad molar de las nanopartículas es del orden de $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Este cálculo solamente toma en cuenta el valor promedio de tamaño de partícula obtenido por TEM, se considera que la geometría de las partículas es perfectamente esférica, que toda la superficie definida por el radio atómico del átomo de mercurio se distribuye en la nanopartícula de forma uniforme y que toda la superficie de la nanopartícula es capaz de interactuar con los átomos de mercurio (II) (naturalmente que estas suposiciones no son válidas en la realidad, pero es útil a los efectos de poder estimar un valor medio de referencia para poder estimar la cantidad de átomos de mercurio que pueden ser amalgamados sobre la superficie de una nanopartícula).

Teniendo estas consideraciones en cuenta, se calcula que para un diámetro promedio de 12.5 nm la superficie que define la esfera ($4r^2\pi$) es de 490.88 nm. Si ahora se considera el radio atómico del mercurio (150 pm), el cálculo de unidad de superficie para este radio es de 0.28 nm que corresponde a la superficie teórica de un átomo esférico de mercurio. Luego la relación entre el área de mercurio y la nanopartícula de 12.5 nm de diámetro es de 1753:1. Partiendo de una absorbancia de 1.5 para una dilución al tercio de nanopartículas sintetizadas, eso define una concentración de partículas de 0.5×10^{-9} M que tomando en cuenta la relación de áreas anteriormente calculadas entre el mercurio y las nanopartículas, se necesitaría entonces una concentración de 0.88×10^{-6} de mercurio para amalgamar

completamente la superficie de las nanopartículas de plata. Estos cálculos sugieren que si el mercurio se distribuye de forma uniforme en todas las partículas, los cambios significativos en el tamaño recién se estarían observando a partir de valores del entorno del orden de 10^{-7} a 10^{-6} M, lo cual es concordante con los resultados de DLS donde el primer salto significativo en el tamaño de las partículas se observa recién a partir de 5×10^{-6} M de Hg(II).

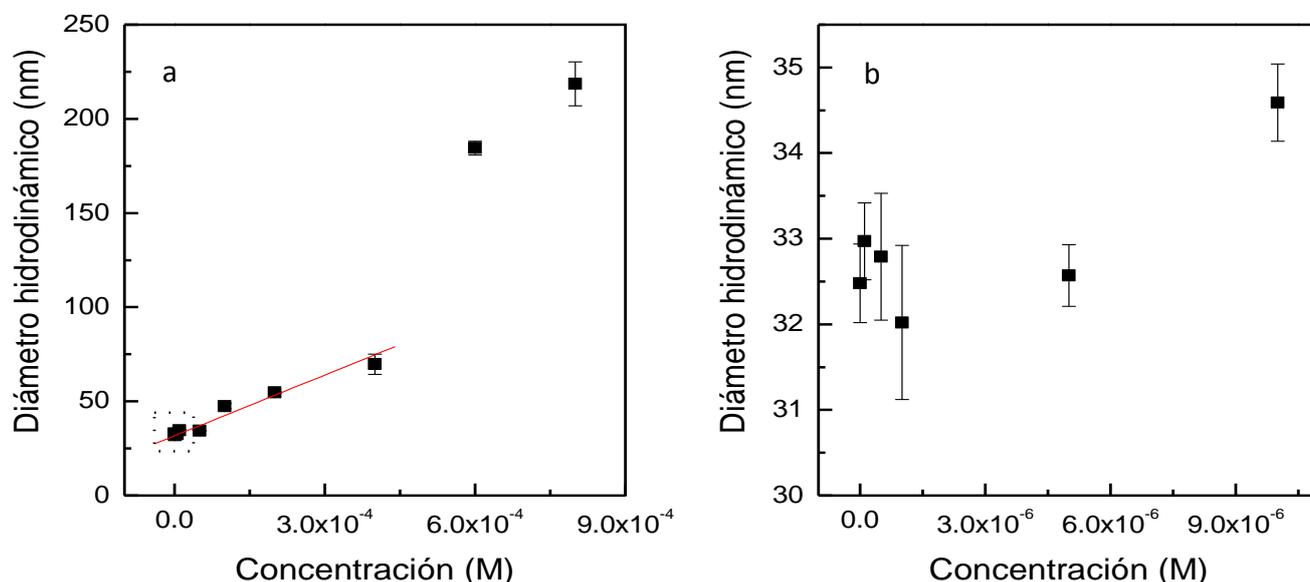


Figura 4: Efecto del agregado de mercurio (II) sobre las nanopartículas de plata (a) y el correspondiente aumento de la imagen mostrada en línea punteada a bajas concentraciones (b).

El aumento del tamaño de las nanopartículas es lineal con la concentración de mercurio para valores entre 0 y 5×10^{-4} M observándose un salto exponencial con grandes crecimientos en el tamaño promedio de las nanopartículas a valores mayores, lo cual sugiere que existe una concentración crítica para la cual el mercurio deja de amalgamarse solamente de forma superficial y en su lugar comienza a operar el fenómeno de agregación de partículas producto del gran tamaño alcanzado. Este salto ocurre a los 6×10^{-4} M de Hg.

Debido a que el proceso de amalgamación de la plata con el mercurio es un fenómeno de superficie, suena lógico que la intensidad de la respuesta de los cambios en el plasmón dependerá en definitiva de la cantidad de superficie expuesta de la nanopartícula para poder interactuar con los iones de mercurio disueltos. Es por esto que en teoría el límite de detección del sistema variará dependiendo de la concentración de nanopartículas empleadas. La Figura 5b muestra esta dependencia en los espectros UV-Vis de volúmenes

crecientes de nanopartículas de plata agregados sobre una disolución de mercurio 5×10^{-6} M, observándose la aparición del pico de absorbanza recién luego del agregado de 45 μ L de una disolución de nanopartículas, lo cual pone en evidencia la necesidad de trabajar con concentraciones bajas de nanopartículas para aumentar el límite de resolución del sensor basado en los cambios de plasmón mediante la formación de amalgamas. El aumento de la línea de base observado al agregar las nanopartículas obedece a la dispersión de luz por parte de las partículas agregadas y a la presencia de almidón en la solución, mientras que el máximo característico a 400 nm solamente se observa tras alcanzar la concentración crítica de nanopartículas capaz de amalgamar el mercurio presente (Figura 5). En comparación idénticos volúmenes, con la misma concentración de nanopartículas, agregadas sobre una solución de agua, muestra que las señal aparecen desde los primeros 5 μ L agregados (Figura 6). La capacidad que tiene la nanopartícula de plata de amalgamar el mercurio en tiempos cortos (menores a 13 min, Figura 1) permite que las mismas puedan ser utilizadas no solo como sensores sino también como agentes de remediación de aguas¹⁹¹. Por su parte, en ausencia de mercurio, el agregado de una misma concentración y volumen de nanopartículas sobre agua, muestra la presencia de un máximo de absorbanza a 400 nm con el primer agregado de nanopartículas a 5 μ L. Teniendo todo esto en cuenta, trabajando a bajas concentraciones, es posible bajar el límite de detección a valores del torno a los 0.5×10^{-7} M considerando únicamente el corrimiento de la absorbanza hacia longitudes de onda de menor energía (Figura 5).

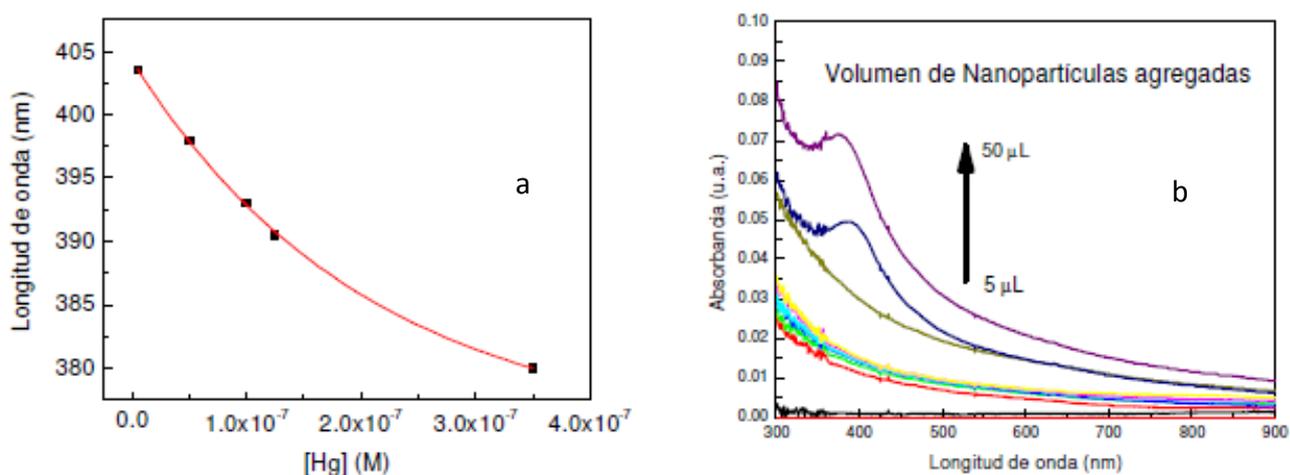


Figura 5: Variación de la longitud de onda correspondiente al máximo de absorbanza del plasmón de las nanopartículas de plata vs. la concentración de mercurio (a). Estudio del efecto del agregado de volúmenes crecientes de nanopartículas de plata sobre una concentración final de 5×10^{-6} M de Hg(II) (b) .

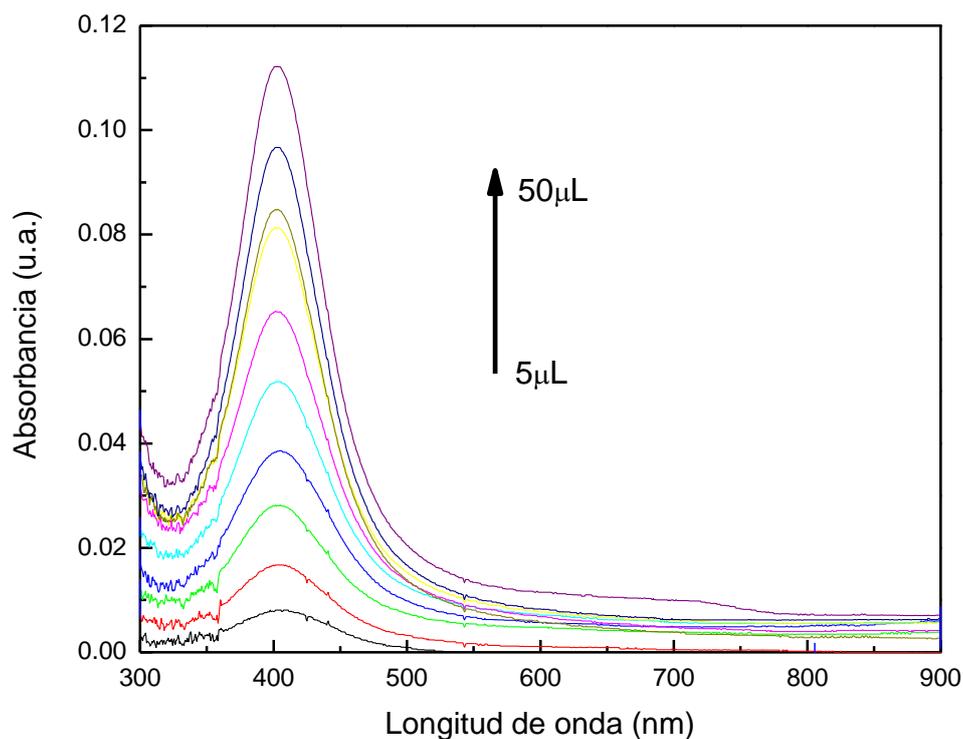


Figura 6: Espectro de absorción de las nanopartículas de plata definido por el agregado de volúmenes de a 5 μL sobre 1 mL de agua ultrapura, mostrando la aparición de señal tras el primer agregado.

El espectro de absorción del mercurio (II) presenta una banda máxima la región ultravioleta del espectro electromagnético, concretamente se observa un pico de gran intensidad a 200 nm (Figura 7). Si bien esta señal es sensible a bajas concentraciones, no es útil en términos cuantitativos, dado que es sabido que la gran mayoría de los metales y las sales también absorben en esta región del espectro.

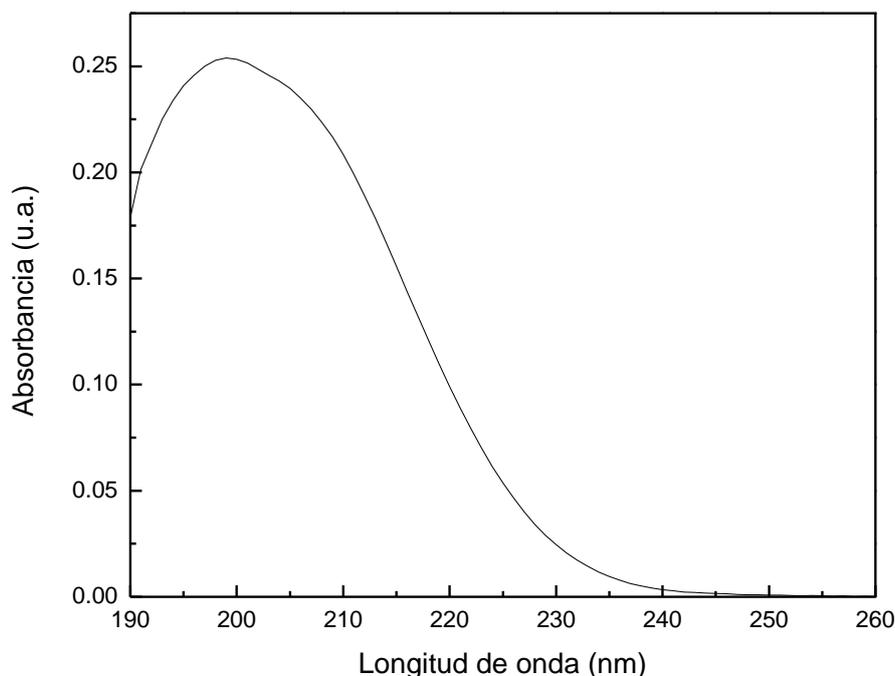


Figura 7: Espectro de absorción del mercurio (II) en el UV, para una concentración de 1×10^{-7} M.

Anteriormente se hizo énfasis en la importancia de los aniones, en especial los cloruros como la principal fuente de interferencia en la respuesta colorimétrica del sensor en presencia de mercurio. De la misma forma es relevante analizar el comportamiento de las disoluciones coloidales de nanopartículas de plata frente a la presencia cationes de metales que comúnmente se encuentran en medios reales. Si bien la formación de amalgamas tienen una alta afinidad entre la plata y el mercurio, otros metales como el cadmio o el cobre podría en principio afectar la resonancia del plasmón. En este sentido se evalúan seis de los metales más comunes a una concentración de 1×10^{-3} M, siendo esta muy superior a las ensayadas para los casos del mercurio. Los resultados muestran ligeras interferencias reflejadas en corrimientos de los máximos hacia longitudes de onda de menor energía, exceptuando el caso del hierro donde se observa el efecto contrario. Sin embargo es de notar que el comportamiento observado dista mucho del mostrado en la Figura 5, donde la absorbancia del máximo se corre notoriamente a longitudes de onda de menor energía frente a la presencia de bajas concentraciones de mercurio. El corrimiento del máximo del plasmón, así como también los cambios observados en el ancho medio de pico de las nanopartículas en presencia de los metales, sugiere que a estas concentraciones surgen de

fenómenos de agregación de partículas que se traducen en cambios de tamaño, dando lugar a bandas de absorción a mayores longitudes de onda. El caso más claro de esto se observa en el cromo donde se observa un hombro a 500 y 600 nm junto con el máximo a 400 nm. Por su parte las variaciones en los valores de absorbancia, se atribuyen a los pequeños corrimientos en los máximos producto de los cambios del entorno fisicoquímico dado por la presencia de distintos cationes (Figura 8). Sin embargo, pese a todas las posibles interferencias visualizadas en los cambios de los perfiles espectrales, es claro que el comportamiento difiere notoriamente al observado con el mercurio, donde el máximo únicamente se constataba tras el agregado de 45µL sobre una solución de mercurio del orden de los $5 \times 10^{-6} \text{M}$.

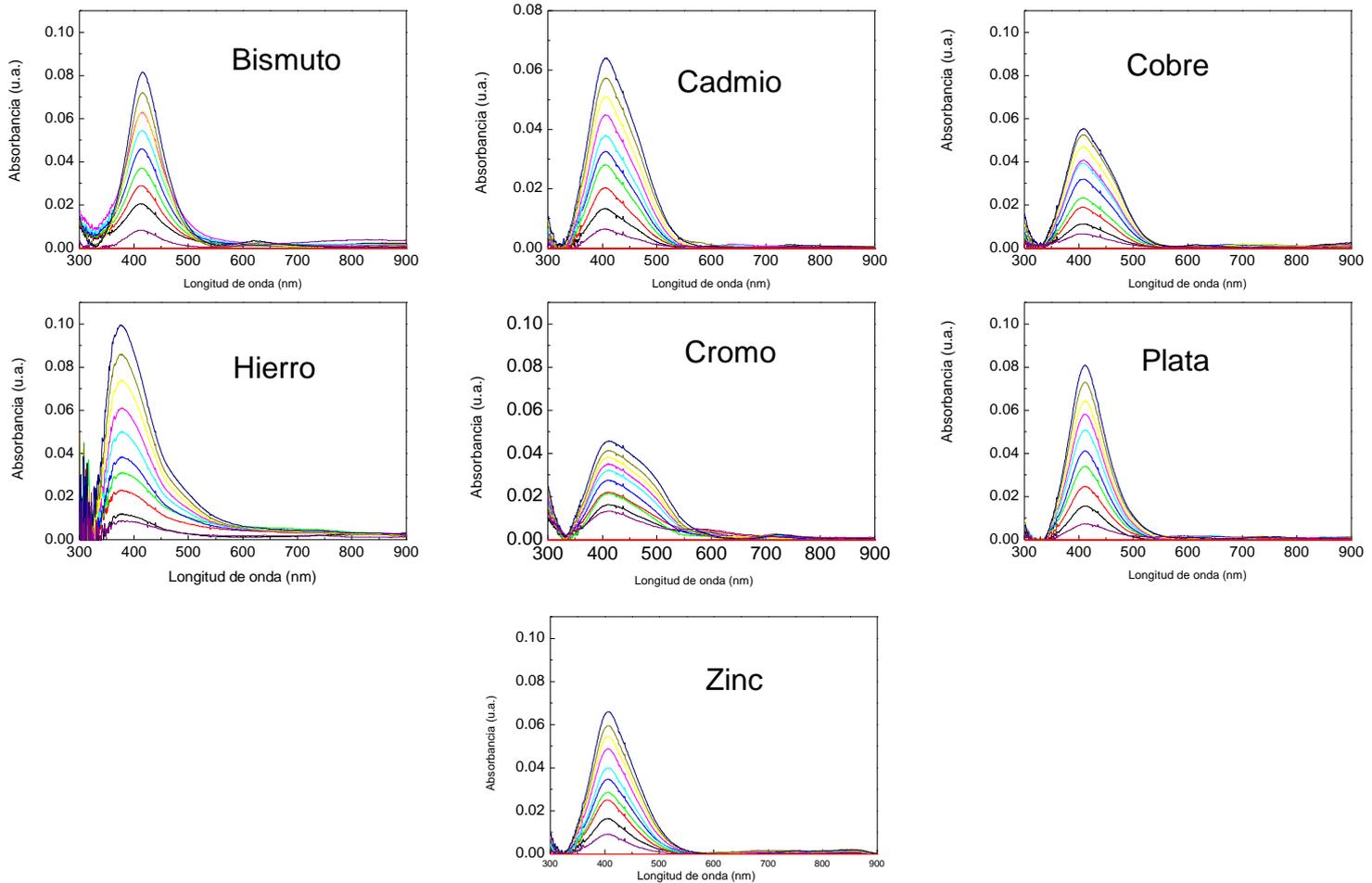


Figura 8: Efecto de las diferentes sales metálicas sobre las nanopartículas de plata. En todos los casos se realizaron adiciones progresivas de 5 a 50 μL de nanopartículas de plata sobre una disolución 1×10^{-3} M de cada sal respectiva.

Teniendo en cuenta las diferentes interferencias existentes, especialmente las que aportan las sales de cloruro y las de algunos metales que pueden también encontrarse en abundancia en ciertos ambientes industriales como el hierro, se explora la alternativa de utilizar las nanopartículas inmovilizadas sobre una superficie sólida, de manera de poder diferenciar los cambios colorimétricos por la agregación de los observados por formación de amalgamas. Se realizaron varios depósitos sobre superficies de papel, sobre vidrio y plásticos. Desde el punto de vista cualitativo, la sensibilidad de estos sistemas disminuye considerablemente observándose un cambio de coloración únicamente a concentraciones altas de mercurio(II) (Figura 9). De cualquier manera los resultados reflejan a ojo desnudo los cambios observados espectrofotométricamente (Figura 5) donde la presencia de

mercurio esconde el máximo a 400 nm responsable de la coloración amarilla observada en las nanopartículas. Los depósitos realizados sobre tubos de plásticos aumentan la resistencia del sistema a los cambios de color en presencia de cloruros, siendo imposible distinguir la coloración hasta un máximo de 0.3M de NaCl, sin embargo a mayores concentraciones se pierde el color amarillo característico de las nanopartículas dejando de ser el método efectivo.



Figura 9: Cambios de color observados sobre depósitos de nanopartículas de plata en tubos de ensayo de plástico. Depósitos en electrodos de vidrio recubiertos de ITO. Se observa un agregado no homogéneo sobre la superficie del electrodo.

Por su parte la resolución de los cambios de coloración observados en tiras de papel pueden ser aumentada empleando un espectrofotómetro. En estos casos se observa el mismo comportamiento que en disolución acuosa, donde el agregado de mercurio genera la desaparición del máximo a 400 nm. Es importante notar que el mercurio se amalgama solamente de forma superficial sobre la nanopartícula, pudiéndose revertir el proceso mediante el empleo de una solución de soda concentrada (1 M) la cual extrae el mercurio, permitiendo observarse la banda característica del plasmón, aunque con menor absorbancia a la inicial, lo cual evidencia que el sistema no es completamente reversible (Figura 10).

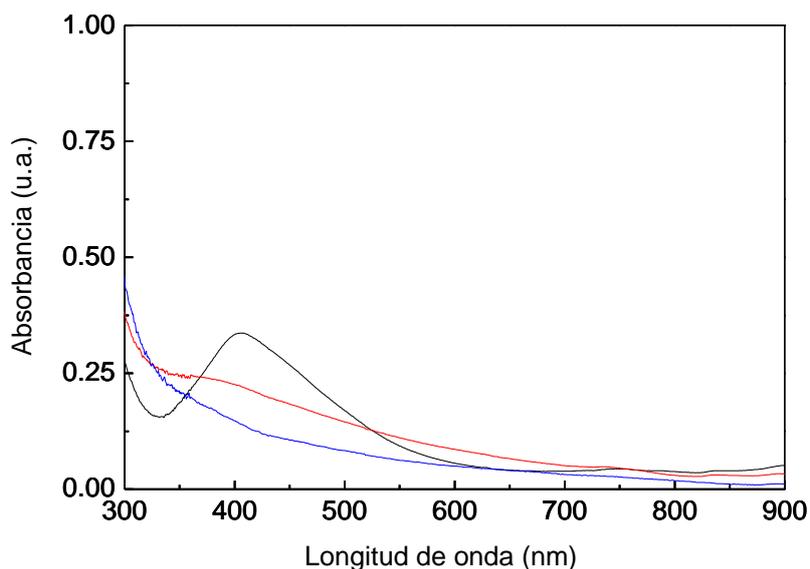


Figura 10: Detección del mercurio sobre tiras de papel. Depósito concentrado de las nanopartículas de plata en filtros de papel mediante ciclos de agregado y evaporado de tres gotas de 10 µL de la solución de nanopartículas (negro). Espectro de las nanopartículas de plata luego del agregado de una gota de 5µL de una disolución de mercurio 1×10^{-3} M (azul). Efecto de la competencia de los OH^- con los mercurios (II) (rojo).

Dado que los métodos de inmovilización suponen una pérdida grande en sensibilidad en comparación con la detección en solución, donde el límite observable se fija en 1×10^{-6} M (Figura 11), es necesario volver sobre los sistemas acuosos, y establecer los límites de viabilidad del sensor en presencia de cloruros. De acuerdo con los resultados presentados en el capítulo VII, los sistemas de agregación se representan por funciones sigmoideas donde a bajas concentraciones de cloruros no se observan cambios significativos en la absorbancia, luego ocurre la zona de transición y finalmente una nueva zona constante que completa la sigmoidea. En este sentido es interesante ver que en principio uno podría establecer una ventana de trabajo a bajas concentraciones de cloruros donde el mismo no afectaría la estabilidad del coloide, al tiempo que acerca el sistema a un umbral donde un pequeño cambio generado por el agregado de mercurio podría desencadenar modificaciones en la nanopartícula y por tanto también en el espectro de absorción. La Figura 12 muestra como en presencia de una concentración de 15 mM de NaCl se observa el aumento de la absorbancia producto del tamaño de la doble capa electroquímica de la nanopartícula, dada por la presencia de un electrolito. Sin embargo, solamente se observa una caída significativa

en la absorbancia, concomitantemente con un corrimiento en la señal hacia longitudes de onda de mayor energía, a concentraciones superiores a 1×10^{-6} M de mercurio

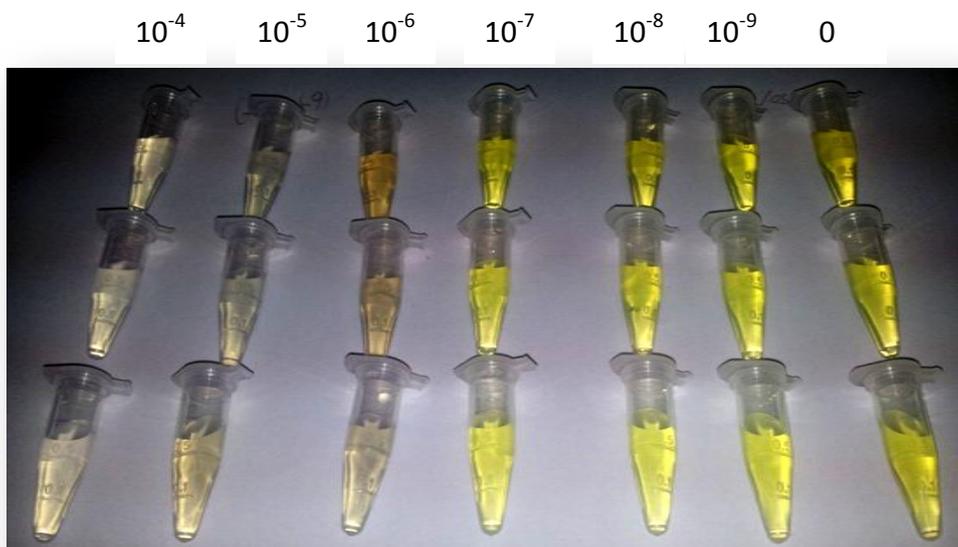


Figura 11: Soluciones de nanopartículas de almidón a diferentes concentraciones de mercurio entre 10^{-4} a 10^{-9} M.

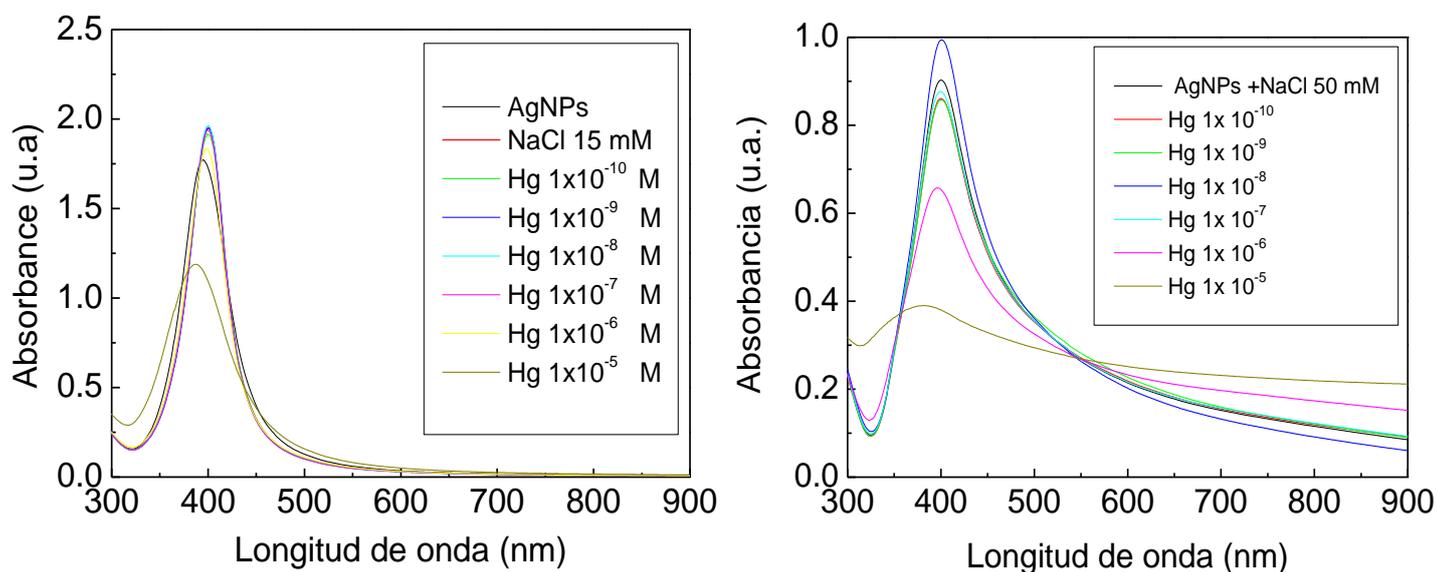


Figura 12: Detección del mercurio en presencia de cloruros (15 mM) (a) y 50 mM (b). En el gráfico se observa la disminución de la absorbancia a 400 nm junto con un corrimiento de la señal que se hace notorio a partir de una concentración de 1×10^{-6} M.

Otra posible alternativa para evitar la interferencia de los cloruros podría ser el empleo de un ligando fuerte como el TBA el cual, a través del grupo tiol, puede unirse covalentemente a la nanopartícula compitiendo de esta manera con los cloruros, pero no así con el mercurio el cuya energía de unión es superior a la del tiol ¹⁹².

La Figura 13 muestra como en presencia de TBA, a diferencia de las nanopartículas recubiertas exclusivamente por almidón, el mercurio genera un corrimiento en la longitud de onda hacia valores de menor energía, posiblemente generado por la presencia de cloruros, los cuales desencadenan el proceso de agregación de las partículas una vez que el tiol se desprende de la misma al interactuar con el mercurio en solución. Por su parte, a altas concentraciones de mercurio del orden de 10^{-5} M se observa en paralelo un corrimiento de la longitud de onda hacia valores de mayor energía, lo cual se lo atribuye al proceso de amalgama que ocurre en simultaneo con la agregación de las nanopartículas.

Si bien el uso de tioles en principio ofrece una mayor estabilidad al sistema, el límite de detección empleando esta técnica disminuye en un orden de magnitud.

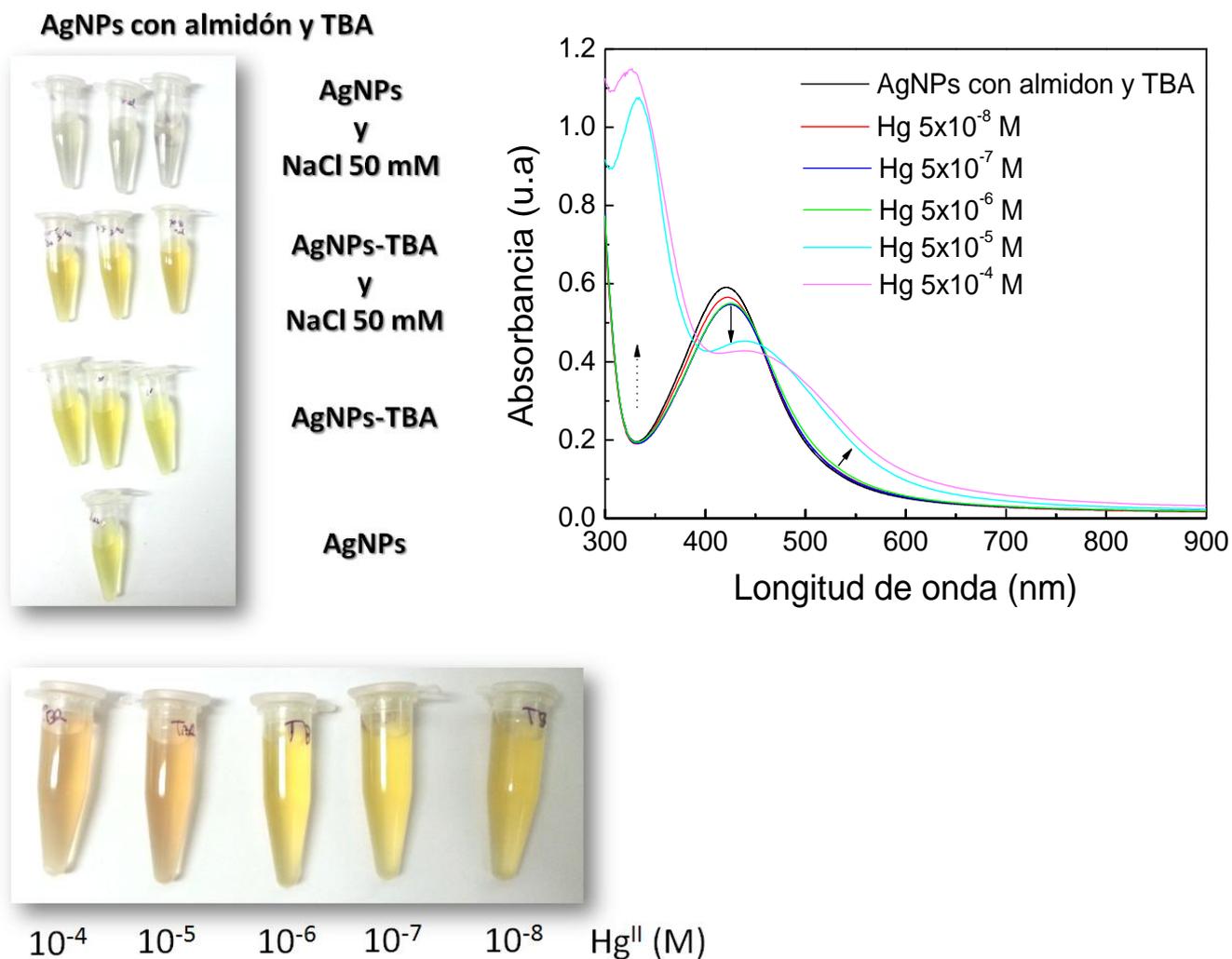


Figura 13: Efecto del agregado de mercurio sobre las nanopartículas de plata recubierta con almidón y TBA. El gráfico muestra como en presencia de mercurio se observan los efectos de formación de amalgama concomitantemente con un proceso de agregación de las partículas.

Si bien los cambios en el plasmón son observables a concentraciones bajas (del orden de nanomolar) estas variaciones se encuentran dentro de los rangos de error de la técnica (Capítulo VII), por lo que la tendencia encontrada no es suficiente para establecer un límite claro que permita la puesta práctica de un sensor colorimétrico. El límite real aparece en el orden de los micro moles por lo que es deseable bajar al menos un orden de magnitud para hacer funcional la técnica en ambientes reales. Anteriormente se describía un límite teórico basado en cálculos, sin embargo como se observaba en los ensayos por DLS, el efecto de la cantidad de mercurio amalgamado se genera sobre la superficie de las nanopartículas generando el cambio de tamaño que afecta el plasmón superficial, determinando en última

instancia la sensibilidad de la técnica. Luego, se plantea como hipótesis de trabajo trabajar con concentraciones menores de nanopartículas, yendo al límite de detección espectrofotométrico. Los resultados presentados en la Figura 14 muestran como a muy bajas concentraciones de nanopartículas es posible detectar concentraciones de mercurio en el orden de $5 \times 10^{-8} \text{ M}$ mediante el corrimiento de la banda máxima del plasmón. Sin embargo estas diferencias son apenas perceptibles por lo que solamente es posible detectar el mercurio de forma cualitativa, considerando la baja relación señal/ruido. Por su parte el aumento de la línea de base hacia longitudes de onda de mayor energía obedece a la absorción de mercurio en el UV.

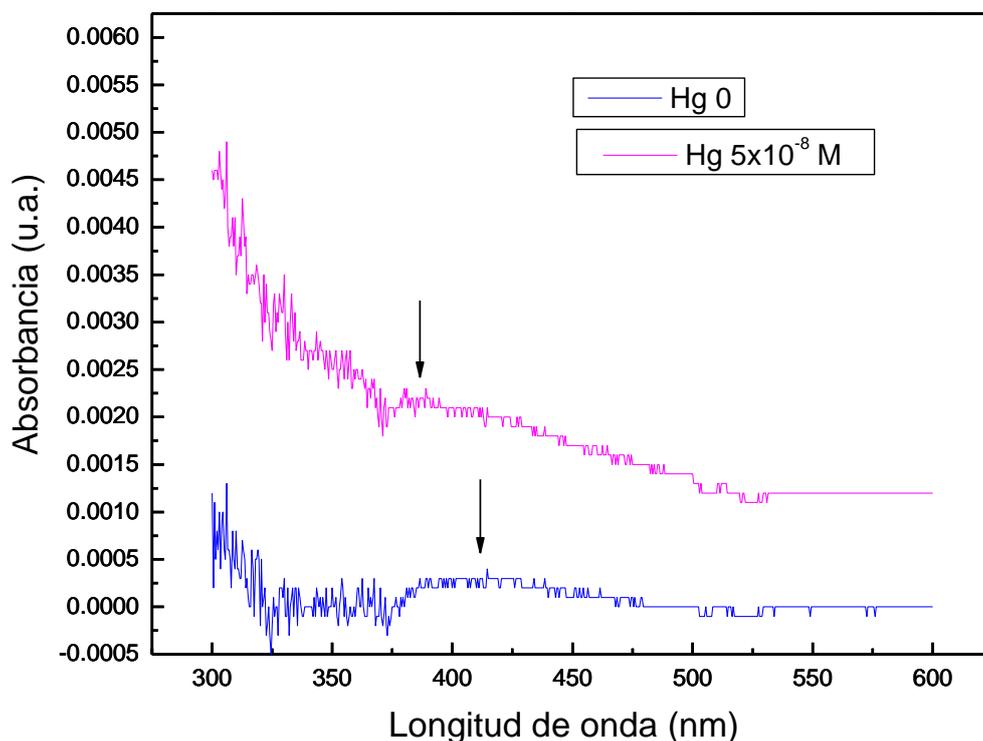


Figura 14: Reducción al límite de la concentración de nanopartícula en presencia y ausencia de una solución $5 \times 10^{-8} \text{ M}$ de Hg.

Si bien es posible bajar la sensibilidad de la técnica disminuyendo la relación nanopartículas mercurio, en términos prácticos no es aconsejable dado que al hacerlo se disminuye también la sensibilidad del equipo de medida perdiéndose resolución de la señal y por tanto los resultados solamente pueden ser útiles como métodos cualitativos.

8.3 Conclusiones

La técnica empleada para la cuantificación de mercurio por formación de amalgamas permite detectar la presencia del analito mediante un cambio de coloración de la solución de nanopartículas, producto del crecimiento en el tamaño que se observa por la formación de la amalgama y del cambio del máximo del plasmón generado por la presencia del mercurio. El límite máximo de detección se encuentra en el orden de $1 \times 10^{-7} \text{M}$ empleando el corrimiento del plasmón como señal de medida. Por su parte los cambios de intensidad, aunque más sensibles, son demasiado susceptibles a los efectos de otras especies presentes en solución, por lo que, contrario a otros trabajos publicados, encontramos que no es una medida útil por sí misma para la detección del mercurio. Si bien el plasmón se ve poco afectado por la presencia de otros metales, la problemática del cloruro es un aspecto de difícil resolución dada la alta afinidad que tiene por la nanopartícula. Respecto a esto, los efectos de interferencias pueden reducirse empleando las nanopartículas inmovilizadas sobre superficies sólidas, no sin el perjuicio de reducir la sensibilidad del sensor.

Capítulo IX: Conclusiones generales y perspectivas futuras

El eje temático central de la propuesta se enfoca en profundizar en los conocimientos básicos de la química coloidal de las nanopartículas de plata, para luego emplear toda la labor de investigación, en la puesta en marcha de una aplicación concreta en la detección colorimétrica del mercurio. En este sentido, el trabajo puede subdividirse en una serie de etapas comenzando con la síntesis de nanopartículas de plata, luego se estudió la estabilidad de las partículas y finalmente se ensayaron pruebas de detección del mercurio (II) empleando la estrategia de formación de amalgamas entre la plata y el mercurio. Asimismo durante la etapa de síntesis, se encontró con la necesidad de evaluar la pureza del borohidruro de sodio, empleado como agente reductor, para lo cual se desarrollo una técnica sencilla, rápida y original de cuantificación por espectroscopía infrarroja. Por su parte, los estudios de estabilidad revelaron un mecanismo diferencial de agregación de las nanopartículas dependientes de la naturaleza de la sal empleada, planteándose evidencias inequívocas de la formación de especies de cloruro de plata como las principales responsables de la agregación de partículas. En paralelo se desarrolló un modelo termodinámico, que permite entender de forma global el proceso de agregación. Finalmente se ensaya una estrategia para la detección de mercurio, lográndose un límite de detección de 1×10^{-7} M.

Por último es importante resaltar, para los trabajos futuros en el área, la necesidad de tener en cuenta el control de los factores que afectan la estabilidad coloidal de las nanopartículas, que de acuerdo con la bibliografía consultada, la gran mayoría de las técnicas de cuantificación de mercurio solamente ensayan la interferencia de otros metales, dejando de lado la importancia de controlar la fuerza iónica, resistencia a los cloruros y presencia de tioles, los cuales se encuentran en abundancia en ambientes reales.

Referencias

- 1 Tan, Z. & Liu, J. Visual Test of Subparts per Billion-Level Mercuric Ion with a Gold Nanoparticle Probe after Preconcentration by Hollow Fiber Supported Liquid Membrane. *Anal Chem* **82**, 4222-4228 (2010).
- 2 Wang, Y., Yang, F. & Yang, X. Colorimetric Detection of Mercury(II) Ion Using Unmodified Silver Nanoparticles and Mercury-Specific Oligonucleotides. *ACS Applied Materials and Interfaces* **2**, 339–342 (2010).
- 3 Kerstin, L., Foulkes, M. & Worsfold, P. Methods for the determination and speciation of mercury in natural waters—A review. *Analytica Chimica Acta* **663**, 127-138 (2010).
- 4 Fan, A., Ling, Y., Laua, C. & Lu, J. Direct colorimetric visualization of mercury (Hg^{2+}) based on the formation of gold nanoparticles. *Talanta* **82**, 687-692 (2010).
- 5 Agasti, S. S. *et al.* Nanoparticles for detection and diagnosis. *Advanced Drug Delivery Reviews* **62**, 316–328 (2010).
- 6 Knecht, M. R. & Sethi, M. Bio-inspired colorimetric detection of Hg^{2+} and Pb^{2+} heavy metal ions using Au nanoparticles. *Anal Bioanal Chem* **394**, 33-46 (2009).
- 7 Wang, L. *et al.* Nanoparticle-based environmental sensors. *Materials Science and Engineering R*, doi:10.1016/j.mser.2010.06.012 (2010).
- 8 Wang, Z. & Ma, L. Gold nanoparticle probes. *Coordination Chemistry Reviews* **253** 1607–1618 (2009).
- 9 Liu, J., Cao, Z. & Lu, Y. Functional Nucleic Acid Sensors. *Chem Rev* **109**, 1948-1998 (2009).
- 10 Kelly, K. L., Coronado, E., Zhao, L. L. & Schatz, G. C. The optical properties of metal nanoparticles: The influence of size, shape, and dielectric environment. *J. Phys. Chem. B* **107**, 668-677 (2003).
- 11 Lee, K. Y. *et al.* Novel Colorimetric Sensing of Anion with Gold Nanoparticles-Embedded Plasticized Polymer Membrane. *Bull. Korean Chem. Soc.* **27**, 2081-2083 (2006).
- 12 Liu, Z. D., Li, Y. F., Ling, J. & Huang, C. Z. A Localized Surface Plasmon Resonance Light-Scattering Assay of Mercury (II) on the Basis of Hg^{+} -DNA Complex Induced Aggregation of Gold Nanoparticles. *2009* **43**, 5022-5027 (2009).
- 13 Mao, S., Lu, G., Yu, K. & Chen, J. Specific biosensing using carbon nanotubes functionalized with gold nanoparticle–antibody conjugates. *Carbon* **48**, 479-486 (2010).
- 14 Kawaguchia, T. *et al.* Surface plasmon resonance immunosensor using Au nanoparticle for detection of TNT. *Sensors and Actuators B* **133**, 467-472 (2008).
- 15 Singh, M., Sinha, I., Singh, A. & Mandal, R. Formation of fractal aggregates during green synthesis of silver nanoparticles. *J Nanoparticle Res*, doi:10.1007/s11051-010-0001-8 (2010).
- 16 Jingyu, L. & Hurt, R. H. Ion release kinetics and particle persistence in aqueous nano-silver colloids. *Environ. Sci. Technol.* **44**, 2169–2175 (2010).
- 17 Cañamares, M. V., Garcia-Ramos, J. V., Gómez-Varga, J. D., Domingo, C. & Sanchez-Cortes, S. Comparative Study of the Morphology, Aggregation Adherence to Glass, and Surface-Enhanced Raman Scattering Activity of Silver Nanoparticles Prepared by Chemical Reduction of Ag^{+} Using Citrate and Hydroxylamine. *Langmuir* **21**, 8546-8553 (2005).
- 18 Rouhana, L. L., Jaber, J. A. & Schlenoff, J. B. Aggregation-Resistant water-Soluble Gold Nanoparticles. *Langmuir* **23**, 12799-12801 (2007).
- 19 Zhang, Z. & wu, Y. Investigation of the $NaBH_4$ Induced Aggregation of Au Nanoparticles. *Langmuir* **26**, 9214-9223 (2010).
- 20 Shipway, A. N., Lahav, M., Gabai, R. & willner, I. Investigations into the Electrostatically induced Aggregation of Au Nanoparticles. *Langmuir* **16**, 8789-8795 (2000).
- 21 Gang, W., Yu, Z., Yiping, C., Muyun, D. & Mi, L. Study on the non-linear refraction of silver nanoparticles with aggregation effect. *Optics Communications* **249**, 311-317 (2005).
- 22 El-Badawy, A. M., Luxton, T. P., Silva, R. G., Suidan, M. T. & Tolaymat, T. M. Impact of environmental conditions (pH, ionic strength, and electrolyte type) on the surface charge

- and aggregation of silver nanoparticles suspensions. *Environ. Sci. Technol.* **44**, 1260-1266 (2010).
- 23 Ogendal, L. *Light scattering demystified*. (University of Copenhagen, 2013).
- 24 Taylor, A. E. F. *Illumination fundamentals*. (Rensselaer Polytechnic Institute, 2000).
- 25 Regato, J. A. d. Our History and Heritage. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.* **5**, 2097-2111 (1979).
- 26 Mochán, W. L. Plasmons. *Centro de Ciencias Físicas, Universidad Nacional Autónoma de México* **62251**, 1-11 (1991).
- 27 Mie, G. Consideraciones sobre la óptica de los medios turbios, especialmente soluciones coloidales. *Annalen der physik* **25**, 377-344 (1908).
- 28 Kumbhar, A. S., Kinnan, M. K. & Chumanov, G. Multipole Plasmon Resonances of Submicron Silver Particles. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 12444-12445 (2005).
- 29 Brioude, A. & Pileni, M. P. Silver nanodisks: Optical properties study using the discrete dipole approximation method. *J. Phys. Chem. B.* **109**, 23371-23377 (2005).
- 30 Desai, R., Mankad, V., Gupta, S. K. & Jha, P. K. Size distribution of silver nanoparticles: UV-Visible spectroscopic assessment. *Nanosci. Nanotechnol. Lett.* **4**, 30-34 (2012).
- 31 Wriedt, T. The Mie theory. *Springer*, 53-71, doi:DOI: 10.1007/978-3-642-28738-1_2 (2012).
- 32 Einstein, A. *Investigations on the theory of the brownian movement*. (Dover Publications, 1956).
- 33 Renn, J. Einstein's invention of Brownian motion. *Ann. Phys.* **23 – 37 (2005)** **14**, Supplement, 23 – 37 (2005).
- 34 Provencher, S. W. & Štěpánek, P. Global analysis of dynamic light scattering autocorrelation functions. *Part. Part. Syst. Char.* **13**, 291-294 (1996).
- 35 Brookhaven. *Zetasizer nano series. User Manual*. (Malvern Instruments, 2004).
- 36 Stuart, B. *Infrared spectroscopy: Fundamentals and applications*. (John Wiley & Sons, 2004).
- 37 Shimadzu. *Important points related to KBr pellet method*, <<http://www.shimadzu.com/an/ftir/support/ftirtalk/a370/tech.html>> (1999).
- 38 Klabunde, K. J. *Nanoscale material in chemistry*. (John Wiley & Sons, 2001).
- 39 Vázquez, G. & Echeverría, O. *Introducción a la Microscopía electrónica Aplicada a las Ciencias Biológicas*. (Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México Fondo cultura Económica, 2002).
- 40 Howe, J. M. & Fultz, B. *Transmission Electron Microscopy*. (Springer, 2008).
- 41 Williams, D. B. & Carter, C. B. *Transmission electron microscopy*. (Springer 1996).
- 42 Poole, C. P. & Owens, F. J. in *Introduction to nanotechnology* Ch. 1-8, (John Wiley & Sons 2003).
- 43 Echeverría, G. V. O. *Introducción a la Microscopía electrónica Aplicada a las Ciencias Biológicas*. (Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México Fondo cultura Económica, 2002).
- 44 Jenkins, R. & L.Snyder, R. *Introduction to X-Ray Powder Diffractometry*. (John Wiley & Sons, 1996).
- 45 Zevin, L. S. & Kimmel, G. *Quantitative X-Ray Diffractometry*. (Springer-Verlag New York, inc, 1995).
- 46 Bard, A. J. & Faulkner, L. R. *Electrochemical methods, fundamentals and applications* (John Wiley & Sons, 1980).
- 47 Pingarrón, J. M. & Sánchez, P. *Química electroanalítica. Fundamentos y aplicaciones*. (Síntesis, 1999).
- 48 Mabbott, G. A. An Introduction to Cyclic Voltammetry. *J. Chem. Educ.* **60**, 697-702 (20).
- 49 Calahorra, C. V. in *Química general. Introducción a la química teórica* Ch. 17, 335-346 (Salamanca, 1995).
- 50 Rodriguez, L. J. in *Sistemas Coloidales en Farmacia* (Universidad de Salamanca, 2008).

- 51 Kerker, M. Classics and classicists of colloid and interface science: 6. John Tyndall. *J. Colloid Interface Sci.* **119**, 602-604 (1987).
- 52 Ninham, B. W. On progress in forces since the DLVO theory. *Adv. Colloid Interfac.* **83**, 1-17 (1999).
- 53 Hribar, B. & Vlachy, V. Properties of Polyelectrolyte Solutions as Determined by the Charge of Counterions. *Revista de la Sociedad Química de México* **44**, 11-15 (2000).
- 54 Pashley, R. M. DLVO and Hydration Forces between Mica Surfaces in Li⁺, Na⁺, K⁺, and Cs⁺ Electrolyte Solutions: A Correlation of Double-Layer and Hydration Forces with Surface Cation Exchange Properties. *Journal of Colloid and Interface Science* **83**, 531-546 (1981).
- 55 Boström, M., Williams, D. R. M. & Ninham, B. W. Specific ion effects: Why DLVO theory fails for biology and colloidal systems. *Phys. Rev. Lett.* **87**, 1681031-1681034 (2001).
- 56 McCartney, L. N. & Levine, S. An Improvement for the Double on Deriaguin's Expression Layer Interaction Energy Colloidal Particles at Small Potentials of Two Spherical. *J. Colloid Interface Sci.* **30**, 345 – 354 (1969).
- 57 Xiaochen Xing, Sun, G., Li, Z. & Ngai, T. Stabilization of colloidal suspensions: Competing effects of nanoparticle halos and depletion mechanism. *Langmuir* **28**, 16022-16028 (2012).
- 58 Quinten, M. *Optical properties of nanoparticle systems: Mie and Beyond.* (Wiley-VCH, 2011).
- 59 Botasini, S., Heijo, G. & Méndez, E. Toward decentralized analysis of mercury (II) in real samples. A critical review on nanotechnology-based methodologies. *Anal. Chim. Acta* **800**, 1-11 (2013).
- 60 Kabalnov, S. A. & Shchukin, E. D. Ostwald ripening theory: Applications to fluorocarbon emulsion stability. *Adv. Colloid Interface Sci.* **38**, 69-97 (1992).
- 61 Ma, J., Choudhury, N. A. & Sahai, Y. A comprehensive review of direct borohydride fuel cells. *Renew. Sust. Energ. Rev.* **14**, 183–199 (2010).
- 62 de-Leon, C. P., Walsh, F. C., Pletcher, D., Browning, D. J. & Lakeman, J. B. Direct borohydride fuel cells. *J. Power Sources* **155**, 172–181 (2006).
- 63 Botasini, S., Dalchiele, E. A., Benech, J. C. & Mendez, E. Stabilization of triangular and heart-shaped plane silver nanoparticles using 2-thiobarbituric acid. *J. Nanopart. Res.* **13**, 2819–2828 (2011).
- 64 Lyttle, D. A., Jensen, E. H. & Struck, W. A. Simple Volumetric Assay for Sodium Borohydride. *Anal. Chem.* **24**, 1843–1844 (1952).
- 65 Santos, D. M. F. & Sequeira, C. A. C. Cyclic voltammetry investigation of borohydride oxidation at a gold electrode. *J. Electroanal. Chem.* **627**, 1-8 (2009).
- 66 Beard, A. M., Davis, T. A. & Matthews, M. A. Deliquescence in the hydrolysis of sodium borohydride by water vapor. *Ind. Eng. Chem. Res.* **49**, 9596–9599 (2010).
- 67 Bennici, S., Garron, A. & Auroux, A. Maximizing the hydrogen yield in the catalyzed hydrolysis of pure borohydride powders. *Int. J. Hydrogen Energ.* **35**, 8621-8625 (2010).
- 68 Retnam, R., Novais, A. Q. & Rangel, C. M. Kinetics of hydrolysis of sodium borohydride for hydrogen production in fuel cell applications: A review. *Int. J. Hydrogen. Energ.* **36**, 9772-9790 (2011).
- 69 Botasini, S. & Méndez, E. On the purity assessment of solid sodium borohydride. *J. Power Sources* **197**, 218-223 (2012).
- 70 Murtoma, M., Laine, E., Salonen, J. & OKuusinen. On effects of ambient humidity on sodium borohydride powder. *Powder Handl. Process* **11**, 87-90 (1999).
- 71 Beard, A. M., Marrero-Alfonso, E. Y., Davis, T. A. & Matthews, M. A. New insights into the mechanism of hydrolysis of sodium borohydride. *AIChE Annual Meeting, Conference Proceedings, Philadelphia* (2008).
- 72 Filinchuk, Y. & Hagemann, H. Structure and properties of NaBH₄•2H₂O and NaBH₄. *Eur. J. Inorg. Chem.*, 3127–3133 (2008).
- 73 Jun, L., Shuping, X. & Shiyang, G. FT-IR and Raman spectroscopy study of hydrated borates. *Spectrochim. Acta A* **51**, 519–532 (1995).

- 74 Epstein, N. On tortuosity and the tortuosity factor in flow and diffusion through porous media *Chem. Eng. Sci.* **44**, 777-779 (1989).
- 75 Amendola, S. C. *et al.* A novel high power density borohydride-air cell. *J. Power Sources* **84**, 130–133 (1999).
- 76 Mirkin, M. V. & Bard, A. J. Voltammetric method for the determination of borohydride concentration in alkaline aqueous solutions. *Anal. Chem.* **63**, 532–533 (1991).
- 77 Gyenge, E. Electrooxidation of borohydride on platinum and gold electrodes: implications for direct borohydride fuel cells. *Electrochim. Acta* **49**, 965–978 (2004).
- 78 Denuault, G., Mirkin, M. V. & Bard, A. J. Direct determination of diffusion coefficients by chronoamperometry at microdisk electrodes. *J. Electroanal. Chem.* **308**, 27–38 (1991).
- 79 Colominas, S., McLaerty, J. & Macdonald, D. D. Electrochemical studies of sodium borohydride in alkaline aqueous solutions using a gold electrode. *Electrochim. Acta* **54**, 3575–3579 (2009).
- 80 Hannauer, J., Demirci, U. B., Geantet, C., Herrmann, J. M. & Miele, P. Enhanced hydrogen release by catalyzed hydrolysis of sodium borohydride-ammonia borane mixtures: a solution-state ¹¹B NMR study. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **13**, 3809–3818 (2011).
- 81 Christ, C. L. & Clark, J. R. A Crystal-Chemical Classification of Borate Structures with Emphasis on Hydrated Borates. *Phys. Chem. Minerals* **2**, 59-87 (1977).
- 82 Stepanov, N., Uvarov, V., Popov, I. & Sasson, Y. Study of by-product of NaBH₄ hydrolysis and its behavior at room temperature. *Int. J. Hydrogen Energ.* **33**, 7378-7384 (2008).
- 83 Chambers, C. & Holliday, A. K. *Modern inorganic chemistry.* (Butterworth & Co, 1975).
- 84 Nelson, P. G. *Introduction to inorganic chemistry.* (Peter G. Nelson & Ventus Publishing ApS, 2011).
- 85 Khodashenas, B. & Ghorbani, H. R. Synthesis of silver nanoparticles with different shapes. *Arabian J. Chem.*, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.12.014 (2015).
- 86 Sunkar, S. & Nachiyar, C. V. Biogenesis of antibacterial silver nanoparticles using the endophytic bacterium *Bacillus Cereus* isolated from *Garcinia Xanthochymus*. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **2**, 953-959 (2012).
- 87 Rajan, R., Chandran, K., Harper, S. L., Yunb, S. & Kalaichelvan, P. T. Plant extract synthesized silver nanoparticles: An ongoing source of novel biocompatible materials. *Ind. Crop. Prod.* **70**, 356–373 (2015).
- 88 Sadeghi, B., Mohammadzadeh, M. & Babakhani, B. Green synthesis of gold nanoparticles using *Stevia rebaudiana* leaf extracts: Characterization and their stability. *J. Photoch. Photobio. B* **148**, 101–106 (2015).
- 89 Tolaymat, T. M. *et al.* An evidence-based environmental perspective of manufactured silver nanoparticle in syntheses and applications: A systematic review and critical appraisal of peer-reviewed scientific papers. *Sci. Total Environ.* **408**, 999–1006 (2010).
- 90 Kimling, J. *et al.* Turkevich Method for Gold Nanoparticle Synthesis Revisited. *J. Phys. Chem. B* **110**, 15700-15707 (2006).
- 91 Yonezawa, T. & Kunitake, T. Practical preparation of anionic mercapto ligand-stabilized gold nanoparticles and their immobilization. *Colloid. Surface A.* **149**, 193-199 (1999).
- 92 Brust, M., Fink, J., Bethell, D., Schiffrin, D. J. & Kiely, C. Synthesis and reactions of functionalised gold nanoparticles. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **16**, 1655-1656 (1995).
- 93 Aslan, K., Lakowicz, J. R. & Geddes, C. D. Rapid deposition of triangular silver nanoplates on planar surfaces: application to metal-enhanced fluorescence. *J. Phys. Chem. B* **109**, 6247-6251 (2005).
- 94 Glusker, J. P., Lewis, M. & Rossi, M. *Crystal Structure Analysis for Chemist and Biologists.* (VHC, 1994).
- 95 Gentry, S. T. & Levit, S. D. Stochastic Control: Transition from differentiated to undifferentiated kinetic growth in Ag nanoprisms. *J. Phys. Chem. C* **113**, 12007-12015 (2009).

- 96 Tancredi, P., Botasini, S., Moscoso-Londoño, O., Méndez, E. & Socolovsky, L. Polymer-assisted size control of water-dispersible iron oxide nanoparticles in range between 15 and 100 nm. *Colloid. Surfaces A*. **464**, 46–51 (2015).
- 97 Botasini, S. & Mendez, E. *Silver Nanoparticles in Real Environments*. Vol. 6 (2012).
- 98 Lide, D. R. *CRC Handbook of Chemistry and Physics* 90 edn, (CRC Press: Boca Raton, 2010).
- 99 Xiu, Z., Ma, J. & Alvarez, P. J. J. Differential effect of common ligands and molecular oxygen on antimicrobial activity of silver Nanoparticles versus silver ions. *Environ. Sci. Technol.* **45**, 9003–9008 (2011).
- 100 Wojtysiak, S. & Kudelski, A. Influence of oxygen on the process of formation of silver nanoparticles during citrate/borohydride synthesis of silver sols. *Colloid. Surfaces A*. **410**, 45–51 (2012).
- 101 Carissimi, G. *Nanopartículas de plata para su uso como agente antibacteriano* Licenciado en Bioquímica, Facultad de Ciencias. Universidad de la República, (2016).
- 102 Botasini, S. & Mendez, E. Silver nanoparticle aggregation not triggered by an ionic strength mechanism. *J. Nanopart. Res.* **15**, 1526–1533 (2013).
- 103 Ivanova, O. S. & Zamborini, F. P. Size-dependent electrochemical oxidation of silver nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 70–72 (2010).
- 104 Liu, J. & Jiang, G. *Silver Nanoparticles in the Environment*. (Springer, 2015).
- 105 Levard, C., Hotze, E. M., Lowry, G. V. & Jr., G. E. B. Environmental Transformations of Silver Nanoparticles: Impact on Stability and Toxicity. *Environ. Sci. Technol.* **46**, 6900–6914 (2012).
- 106 Li, X., Lenhart, J. J. & Harold, W. W. Dissolution-Accompanied Aggregation Kinetics of Silver Nanoparticles. *Langmuir* **26**, 16690–16698 (2010).
- 107 Li, X., Lenhart, J. J. & Walker, H. W. Aggregation kinetics and dissolution of coated silver nanoparticles. *Langmuir* **28**, 1095–1104 (2012).
- 108 Durán, N., Marcato, P. D., Souza, G. I. H. D., Alves, O. L. & Esposito, E. Antibacterial effect of silver nanoparticles produced by fungal process on textile fabrics and their effluent treatment. *J. Biomed. Nanotechnol.* **3** (2007).
- 109 Rai, M., Yadav, A. & Gade, A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnol. Adv.* **27**, 76–83 (2009).
- 110 Huo, S., Xue, X., Li, Q., Xu, S. & Cai, W. Seeded-growth approach to fabrication of silver nanoparticle films on silicon for electrochemical atr surface-enhanced ir absorption spectroscopy. *J. Phys. Chem. B* **110**, 25721–25729 (2006).
- 111 Xiong, D., Chen, M. & Li, H. Synthesis of para-sulfonatocalix[4]arene-modified silver nanoparticles as colorimetric histidine probes. *Chem Commun* 2008:880–2. *Science of the Total Environment* **408**, 999–1006 (2010).
- 112 Navaladian, S., Viswanathan, B., Varadarajan, T. K. & Viswanath, R. P. Microwave-assisted rapid synthesis of anisotropic Ag nanoparticles by solid state transformation. *Nanotechnol.* **19**, 1–7 (2008).
- 113 Kim, S. H., Choi, B. S., Kang, K., Y. Choi & Yang, S. I. Low temperature synthesis and growth mechanism of Ag nanowires. *J. Alloys Compd.* **433**, 261–265 (2007).
- 114 Deshmukh, R. D. & Composto, R. J. Surface segregation and formation of silver nanoparticles created in situ in poly(methyl methacrylate) films. *Chem. Mater.* **19**, 745–799 (2007).
- 115 Liu, J., Wang, A., Chi, Y., Lin, H. & Mou, C. Synergistic effect in an au-ag alloy nanocatalyst: CO oxidation. *J Phys Chem B* **109**, 40–43 (2005)
- 116 Ameen, K. B., Rajasekar, K. & Rajasekharan, T. Silver nanoparticles in mesoporous aerogel exhibiting selective catalytic oxidation of benzene in CO₂ free air. *Catal. Lett.* **119**, 289–384 (2007).
- 117 Hamal, D. B. & Klabunde, K. J. Synthesis, characterization, and visible light activity of new nanoparticle photocatalysts based on silver, carbon, and sulfur-doped TiO₂. *J. Colloid. Interface Sci.* **311**, 514–536 (2007).

- 118 Fernández, E. J. *et al.* The preparation of highly active antimicrobial silver nanoparticles by an organometallic approach. *Nanotechnol.* **19**, 1-6 (2008).
- 119 Braune, B. *et al.* Mercury in the marine environment of the Canadian Arctic: Review of recent findings. *Sci. Total Environ.* **509–510**, 67–90 (2015).
- 120 Damiano, S., Papetti, P. & Menesatti, P. Accumulation of heavy metals to assess the health status of swordfish in a comparative analysis of Mediterranean and Atlantic areas. *Mar Pollut Bull* **62**, 1920–1925 (2011).
- 121 Clarkson, T. W. Human Toxicology of Mercury. *J. Trace Elem. Exp. Med.* **8**, 303–317 (1998).
- 122 Bridges, C. C. *et al.* New insights into the metabolism of organomercury compounds: mercury-containing cysteine S-conjugates are substrates of human glutamine transaminase K and potent inactivators of cystathionine γ -lyase. *Arch. Biochem. Biophys.* **517**, 20-29 (2012).
- 123 UNEP. *Uruguay da un paso más hacia la ratificación del convenio internacional sobre mercurio.*, <<http://www.mvotma.gub.uy/sala-de-prensa/noticias/item/10005255-uruguay-da-un-paso-mas-hacia-la-ratificacion-del-convenio-internacional-sobre-mercurio.html>> (2014).
- 124 UNEP. *Nuevo tratado mundial limita las emisiones y liberaciones de mercurio y establece controles* <<http://www.unep.org/newscentre/default.aspx?DocumentID=2752&ArticleID=9647&l=es>> (2013).
- 125 UNEP. *Proyecto de Convenio de Minamata sobre el Mercurio* <http://www.unep.org/chemicalsandwaste/Portals/9/Mercury/Documents/INC5/57sannex_advance.pdf> (2013).
- 126 Llop, S. *et al.* Exposure to mercury among Spanish preschool children: Trend from birth to age four. *Environ Res* **132**, 83-92 (2014).
- 127 Anichina, J., Dobrusin, Z. & Bohme, D. K. Detection of T-T mismatches using mass spectrometry specific interactions of Hg(II) with oligonucleotides rich in thymine (T) *J. Phys. Chem. B* **114**, 15106-15112 (2010).
- 128 Persson, I., Eriksson, L., Lindgvist-Reis, P., Persson, P. & Sandström, M. An EXAFS spectroscopic, large-angle X-ray scattering, and crystallographic study of hexahydrated, dimethyl sulfoxide and pyridine 1-oxide hexasolvated mercury(II) ions. *Chem-Eur. J.* **14**, 6687-6696 (2008).
- 129 Persson, I. Hydrated metal ions in aqueous solution: How regular are their structures? *Pure Appl. Chem.* **82**, 1901-1917 (2010).
- 130 Tai, H.-C. & Lim, C. Computational Studies of the Coordination Stereochemistry, Bonding, and Metal Selectivity of Mercury[†]. *The Journal of Physical Chemistry A* **110**, 452-462, doi:10.1021/jp0529826 (2005).
- 131 Pearson, R. G. Hard and Soft Acids and Bases. *Journal of the American Chemical Society* **85**, 3533-3539, doi:10.1021/ja00905a001 (1963).
- 132 Ravichandran, M. Interactions between mercury and dissolved organic. *Chemosphere* **55**, 319–331 (2004).
- 133 Mantoura, R. F. C., Dickson, A. & Riley, J. P. The Complexation of Metals with Humic Materials in Natural Waters *Estuarine and Coastal Marine Science* **6**, 387-408 (1978).
- 134 Cardiano, P., Cucinotta, D., Foti, C., Giuffrè, O. & Sammartano, S. Potentiometric, Calorimetric, and ¹H NMR Investigation on Hg²⁺-Mercaptocarboxylate Interaction in Aqueous Solution. *Journal of Chemical & Engineering Data* **56**, 1995-2004, doi:10.1021/je101007n (2011).
- 135 Mertens, S. F. L. *et al.* Au@Hg nanoalloy formation through direct amalgamation: Structural, spectroscopic, and computational evidence for slow nanoscale diffusion. *Advanced Functional Materials* **21**, 3259-3267, doi:10.1002/adfm.201100409 (2011).

- 136 Katok, K. V. *et al.* Hyperstoichiometric interaction between silver and mercury at the nanoscale. *Angew Chem Int Ed Engl* **51**, 2632-2635, doi:10.1002/anie.201106776 (2012).
- 137 Siddiqui, S. A., Bouarissa, N., Rasheed, T. & Al-Assiri, M. S. Quantum chemical study of the interaction of elemental Hg with small neutral, anionic and cationic Aun (n = 1-6) clusters. *Materials Research Bulletin* **48**, 995-1002, doi:10.1016/j.materresbull.2012.11.091 (2013).
- 138 Sun, L. *et al.* A DFT study of the interaction of elemental mercury with small neutral and charged silver clusters. *Chemical Physics Letters* **517**, 227-233, doi:10.1016/j.cplett.2011.10.033 (2011).
- 139 Leopold, K., Foulkes, M. & Worsfold, P. Development and validation of a method for mercury determination in seawater for the process control of a candidate certified reference material. *Anal. Chim. Acta* **663**, 127-138 (2010).
- 140 Clesceri, L. S., Greenberg, A. E. & Eaton, A. D. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. (Water Environment Federation, 1999).
- 141 Horvat, M. in *Dynamics of Mercury Pollution on Regional and Global Scales* 153-190 (Springer 2005).
- 142 Augelli, M. A., Munoz, R. A. A., Richter, E. M., Cantagallo, M. I. & Angnes, L. Analytical procedure for total mercury determination in fishes and shrimps by chronopotentiometric stripping analysis at gold film electrodes after microwave digestion. *Food Chem.* **101**, 579-584 (2007).
- 143 EPA-methods. Health Effects of Mercury and Mercury Compounds 452/R-97-007. *Environmental protection agency* **5** (1997).
- 144 Lee, J. S., Han, M. S. & Mirkin, C. A. Colorimetric detection of mercuric ion (Hg²⁺) in aqueous media using DNA-functionalized gold nanoparticles. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **46**, 4093-4096 (2007).
- 145 Mattigod, S. V., Fryxell, G. E., Skaggs, R. & Parker, K. E. Novel Nanoporous Sorbents for Removal of Mercury. *Prepr. Pap. Am. Chem. Soc., Div. Fuel Chem.* , 287-288 (2004).
- 146 Delacôte, C., Gaslain, F. O. M., Lebeau, B. & Walcarius, A. Factors affecting the reactivity of thiol-functionalized mesoporous silica adsorbents toward mercury(II). *Talanta* **79**, 877-886 (2009).
- 147 Yantasee, W., Lin, Y., Zemanian, T. S. & Fryxell, G. E. Voltammetric detection of lead(II) and mercury(II) using a carbon paste electrode modified with thiol self-assembled monolayer on mesoporous silica (SAMMS). *Analyst* **128**, 467-472 (2003).
- 148 Nacer, H. *et al.* Miniaturized electrochemical sensor for detection of mercury II ions. *J. Mater. Environ. Sci.* **3**, 846-855 (2012).
- 149 Chansuvarn, W., Tuntulani, T. & Imyim, A. Colorimetric detection of mercury(II) based on gold nanoparticles, fluorescent gold nanoclusters and other gold-based nanomaterials. *Trac-Trend. Anal. Chem.* **65**, 83-96 (2015).
- 150 Oliveira, E. *et al.* Revisiting the use of gold and silver functionalised nanoparticles as colorimetric and fluorometric chemosensors for metal ions. *Sensors and Actuators B* **212**, 297-328 (2015).
- 151 Strode, S., Jaegle, L. & Selin, N. E. Impact of mercury emissions from historic gold and silver mining: Global modeling. *Atmos. Environ.* **43**, 2012-2017 (2009).
- 152 Jarujamrus, P., Amatatongchai, M., Thima, A., Khongrangdee, T. & Mongkontong, C. Selective colorimetric sensors based on the monitoring of an unmodified silver nanoparticles (AgNPs) reduction for a simple and rapid determination of mercury. *Spectrochim. Acta A-M.* **142**, 86-93 (2015).
- 153 He, D., S. Garg & Waite, T. D. H₂O₂-Mediated Oxidation of Zero-Valent Silver and Resultant Interactions among Silver Nanoparticles, Silver Ions, and Reactive Oxygen Species. *Langmuir* **28**, 10266-10275 (2012).

- 154 Stobiecka, M., Molinero, A. A., Chalupa, A. & Hepel, M. Mercury/Homocysteine Ligation-Induced ON/OFF-Switching of a T-T Mismatch-Based Oligonucleotide Molecular Beacon. *Anal. Chem.* **84**, 4970–4978 (2012).
- 155 Miyachi, H., Matsui, T., Shigeta, Y. & Hirao, K. Effects of mercury(II) on structural properties, electronic structure and UV absorption spectra of a duplex containing thymine-mercury(II)-thymine nucleobase pairs. *Physical Chemistry Chemical Physics* **12**, 909–917, doi:10.1039/b912807g (2010).
- 156 Uchiyama, T. *et al.* Raman spectroscopic detection of the T-Hg II-T base pair and the ionic characteristics of mercury. *Nucleic acids research* **40**, 5766–5774, doi:10.1093/nar/gks208 (2012).
- 157 Vasimalai, N. & John, S. A. Mercaptothiadiazole capped gold nanoparticles as fluorophore for the determination of nanomolar mercury(II) in aqueous solution in the presence of 50 000-fold major interferents. *Analyst* **137**, 3349 (2012).
- 158 Huang, L. *et al.* Chemical Reactions of 2,5-Dimercapto-1,3,4-thiadiazole (DMTD) with Metallic Copper, Silver, and Mercury. *J. Phys. Chem. B* **105**, 7984–7989 (2001).
- 159 Liang, G. *et al.* An efficient strategy for unmodified nucleotide-mediated dispersion of magnetic nanoparticles, leading to a highly sensitive MRI-based mercury ion assay. *Anal Chim Acta* **726**, 73–78 (2012).
- 160 Zuo, X., Wu, H., Toh & Li, S. F. Y. Mechanism of mercury detection based on interaction of single-strand DNA and hybridized DNA with gold nanoparticles. *Talanta* **82**, 1642–1646 (2010).
- 161 Wu, Z. H., Lin, J. H. & Tseng, W. L. Oligonucleotide-functionalized silver nanoparticle extraction and laser-induced fluorescence for ultrasensitive detection of mercury(II) ion. *Biosens. Bioelectron.* **34**, 185–190 (2012).
- 162 Duan, J. & Guo, Z. Y. Development of a test strip based on DNA-functionalized gold nanoparticles for rapid detection of mercury (II) ions. *Chinese Chem. Lett.* **23**, 225–228 (2012).
- 163 Guo, Z. *et al.* A test strip platform based on DNA-functionalized gold nanoparticles for on-site detection of mercury (II) ions. *Talanta* **93**, 49–54 (2012).
- 164 He, Y. *et al.* Visual detection of Hg²⁺ in aqueous solution using gold nanoparticles and thymine-rich hairpin DNA probes. *Biosens. Bioelectron.* **26**, 4464–4470 (2011).
- 165 EPA-methods. EPA Method 7472 *Environmental protection agency* **4** (2013).
- 166 Fanjul-Bolado, P., Hernández-Santos, D., Lamas-Ardisana, P. J., Martín-Pernía, A. & Costa-García, A. Electrochemical characterization of screen-printed and conventional carbon paste electrodes. *Electrochim. Acta* **53**, 3635–3642 (2008).
- 167 Kadara, R. O., Jenkinson, N. & Banks, C. E. Electrochemical characterization of screen-printed and conventional carbon paste electrodes. *Sens. Actuators B* **138**, 556–562 (2009).
- 168 Bernalte, E., Sánchez, C. M. & Gil, E. P. Determination of mercury in ambient water samples by anodic stripping voltammetry on screen-printed gold electrodes. *Anal. Chim. Acta* **689**, 60–64 (2012).
- 169 Zhang, M. *et al.* Three-dimensional paper-based electrochemiluminescence device for simultaneous detection of Pb²⁺ and Hg²⁺ based on potential-control technique. *Biosens. Bioelectron.* **41**, 544–550 (2013).
- 170 Zhu, Z. *et al.* Highly sensitive electrochemical sensor for mercury (II) ions by using a mercury-specific oligonucleotide probe and gold nanoparticle-based amplification. *Anal. Chem.* **81**, 7660–7666. (2009).
- 171 Martín-Yerga, D., González-García, M. B. & Costa-García, A. Use of nanohybrid materials as electrochemical transducers for mercury sensors. *Sens. Actuators B* **165**, 143–150 (2012).
- 172 Rassaei, L., Amiri, M., Cirtiu, C. M., Sillanpää, M. & Sillanpää, F. M. M. Nanoparticles in electrochemical sensors for environmental monitoring. *Trends Anal. Chem. Asian J.* **30**, 1704–1715 (2011).

- 173 Fernández, E. M. & Balbás, L. C. GGA versus Van der Waals density functional results for mixed gold/mercury molecules and pure Au and Hg cluster properties. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **13**, 20863–20870 (2011).
- 174 Tan, W., Radhi, M., Ab-Rahman, M., Kassim, A. & Aust, J. Application studies to voltammetric detection of trace Hg (II) by different modified solid glassy carbon electrode. *J. Basic Appl. Sci.* **5**, 2475–2481 (2011).
- 175 Stebounova, L. V., Guio, E. & Grassian, V. H. Silver nanoparticles in simulated biological media: a study of aggregation, sedimentation, and dissolution. *J. Nanopart. Res.* **13**, 233–244 (2011).
- 176 Du, Y. *et al.* Surface-enhanced Raman scattering chip for femtomolar detection of mercuric ion (II) by ligand exchange. *Anal. Chem.* **85**, 3160–3165 (2013).
- 177 Mulfinger, L., Solomon, S., Bahadory, M., Jeryarajasingam, A. & Rutkowsky, S. Synthesis and study of silver nanoparticles. *J Chem Educ* **28**, 322-325 (2007).
- 178 Philiplaven. *Mie Plot*, <<http://www.philiplaven.com/mieplot.htm>> (2015).
- 179 Segelstein, D. J. *The Complex Refractive index of water*, University of Missouri-Kansas City, (1981).
- 180 Zielinska, A., Skwarek, E., Zaleska, A., Gazda, M. & Hupka, J. Preparation of silver nanoparticles with controlled particle size. *Procedia Chemistry* **1**, 1560–1566 (2009).
- 181 Méndez, E. *et al.* Tautomeric Forms of 2-Thiobarbituric Acid As Studied in the Solid, in Polar Solutions, and on Gold Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* **111**, 3369-3383 (2007).
- 182 Nelson, D. L. & Cox, M. M. *Principios de bioquímica (4 ed.) Lehninger*. (Omega, 2005).
- 183 Singh, M., Sinha, I. & Mandal, R. K. Role of pH in the green synthesis of silver nanoparticles. *Materials Letters* **63**, 425-427 (2009).
- 184 Jiang, X. & Yu, A. B. Silver nanoplates: A highly sensitive material toward inorganic anions. *Langmuir* **24**, 4300-4309 (2008).
- 185 Dean, J. A. *Lange's Handbook of Chemistry*. 15 edn, (McGraw-Hill, Inc, 1999).
- 186 Zayat, M., Einot, D. & Reisfeld, E. In-situ formation of AgCl nanocrystallites in films prepared by the sol-gel and silver nanoparticles in silica glass films. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **10**, 67–74 (1997).
- 187 Wang, W., Lu, W. & Jiang, L. AgCl and Ag/AgCl hollow spheres based on self-assemblies of a multi-amine head surfactant. *J Colloid Inter Sci* **338**, 270-275 (2009).
- 188 Liu, X., Lu, X., Wang, R. & Zhou, H. Silver speciation in chloride-containing hydrothermal solutions from first principles molecular dynamics simulations. *Chem Geol* **294–295**, 103–112 (2012).
- 189 Lampre, I., Pernot, P. & Mostafavi, M. Spectral properties and redox potentials of silver atoms complexed by chloride ions in aqueous solution. *J. Phys. Chem. B* **104**, 6233-6239 (2000).
- 190 Singh, P., Parent, K. L. & Buttry, D. A. Electrochemical solid-state phase transformations of silver nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 5610–5617, doi:10.1021/ja2109536 (2012).
- 191 Sumesh, E., Bootharaju, M. S. & Pradeep, A. T. A practical silver nanoparticle-based adsorbent for the removal of Hg²⁺ from water. *J. Hazard. Mater.* **189**, 450–457 (2011).
- 192 Ma, Y., Y.Pang, F.Liu, Xu, H. & Shen, X. Microwave-assisted ultrafast synthesis of silver nanoparticles for detection of Hg²⁺. *Spectrochim. Acta A-M* **153**, 206–211 (2016).

Esta página ha sido dejada intencionalmente en blanco.

ANEXO I

Precauciones y elementos de seguridad

En el trabajo de laboratorio, se empleó túnica, lentes de protección y guantes de nitrilo para los experimentos con mercurio. La limpieza del material se llevó a cabo con agua regia o con una solución 1:1 v/v de H₂SO₄ cc. y HNO₃ cc. en campana de gases, empleando elementos de protección individual. Las concentraciones empleadas de los principales agentes químicos siempre fueron bajas, con excepción de las mezclas de ácidos fuertes ¹.

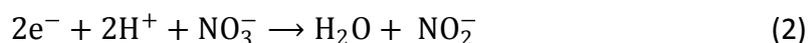
Manipulación y disposición del agua regia

Las soluciones de agua regia son en extremo corrosivas, y pueden producir explosiones o quemaduras en la piel si no se manipulan con cuidado. Se prepararon a partir de una mezcla 1:3 v/v de HNO₃ cc. y HCl cc. Respetando el orden, se agrega lentamente el HNO₃ sobre el HCl en un recipiente de vidrio Pyrex™, bajo campana de extracción de gases. Una vez hecha la mezcla, se debe dejar enfriar con el recipiente abierto. Las soluciones se prepararon frescas y fueron adecuadamente etiquetadas, descartándose después de su uso.

Para desechar el agua regia y las mezclas de ácidos, se diluye 20 veces con agua corriente fría y luego se agregan pequeñas porciones de bicarbonato de sodio o potasio con agitación continua, hasta que no se produzca más espuma ².

Tratamiento de los desechos de las nanopartículas de plata

Una vez terminados los ensayos, las nanopartículas de plata deben descartarse empleando una mezcla de ácidos que puede ser de una relación 1:1 v/v de H₂SO₄ cc. y HNO₃ cc. o alternativamente también puede utilizarse agua regia. En ambos casos el ácido nítrico oxida a la plata generando los iones Ag⁺ los cuales son inofensivos a bajas concentraciones:



Finalmente, las diluciones ácidas concentradas pueden descartarse de forma lenta por dilución con abundante agua en la pileta, manteniendo las mismas precauciones que para el caso del agua regia.

Seguridad en el manejo de las sustancias con mercurio

El mercurio es considerado como un contaminante en todas sus formas, aunque el grado de toxicidad depende del estado químico y físico en el cual se encuentre. El mercurio metálico es el más inofensivo, aunque puede ser absorbido por la piel, generando problemas por bioacumulación. Los compuestos de mercurio (I) son pocos solubles, pero también pueden atravesar la piel siendo fuertemente tóxicos para el organismo. Los compuestos de mercurio (II) son solubles y por lo tanto mucho más tóxicos, siendo el principal contaminante en el ambiente marino. Las formas orgánicas del mercurio como el metil- y dimetil-mercurio son altamente tóxicas, pudiendo tener efectos nocivos en muy bajas concentraciones, además que a diferencia de otras especies químicas, son capaces de atravesar los guantes de latex o polivinilo, por lo que en general se recomienda el empleo de guantes de nitrilo. Por su parte, los vapores de mercurio que se forman incluso a temperatura ambiente, son altamente tóxicos, siendo la concentración umbral 0.1 mg m^{-3} en aire. Estos pueden ocasionar serios problemas de salud si la exposición es prolongada en el tiempo. Sin embargo, en condiciones normales, el oxígeno inhibe la velocidad de evaporación del mercurio ², haciendo que las concentraciones reales del contaminante medidas en la atmósfera del laboratorio se encuentren muy por debajo del valor límite de toxicidad ³.

Para prevenir la contaminación se manipuló el reactivo con la protección adecuada: lentes, túnica y guantes de nitrilo; dentro de lo posible bajo campana de extracción de gases, especialmente para la manipulación de soluciones concentradas de partida. Se trabajó sobre bandejas de plástico sin juntas como medida preventiva ante posibles derrames.

Nunca se debe dejar el mercurio en recipientes abiertos y el ambiente del laboratorio debe ventilarse regularmente. El manejo adecuado del reactivo es indispensable para prevenir daños en el sistema nervioso por la exposición continua al metal ^{3,4}.

La forma recomendada para la eliminación de los desechos con mercurio consiste en transformar el contaminante a una forma más inofensiva empleando sulfuros ⁵. Alternativamente existen productos comerciales como los SAMMS™ los cuales se venden como un polvo de un compuesto poli-tiolado ⁶, diseñados para la captación rápida del

mercurio con buenos rendimientos de absorción, producto de la alta afinidad del grupo tiol que actúa como quelante.

Si bien es posible purificar el metal, en la práctica no es conveniente dado que se necesitan costosos equipos de laboratorio. En su lugar se recomienda el almacenamiento de los desechos en recipientes herméticamente cerrados, para luego ser eliminados por las autoridades competentes.

Referencias

- 1 Botasini, S. *Estudio de la cinética y estabilidad de soluciones de nanopartículas metálicas planas* Licenciado en Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, (2009).
- 2 Lunn, G. & Sansone, E. B. *Destruction of Hazardous Chemicals in the Laboratory*. (John Wiley & Sons, 2012).
- 3 Benjamin, D. J. The effect of gases and vapours on mercury evaporation *Mat. Res. Bull.* **19**, 443-450 (1984).
- 4 Metrohm. *Guía para la correcta manipulación de mercurio*, <www.metrohm.com> (2011).
- 5 Lawrence, N. Mercury disposal via sulfur reactions. *J. Environ. Eng.* **124**, 945-952 (1998).
- 6 Sangvanich, T., Morry, J., Fox, C., Ngamcherdtrakul, W., Goodyear, S., Castro, D., Fryxell, G. E., Addleman, R. S., Summers, A.O., Yantasee, W. Novel oral detoxification of mercury, cadmium, and lead with thiol-modified nanoporous silica. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **6**, 5483-5493 (2014).

ANEXO II

Cálculo del coeficiente de extinción molar de las nanopartículas de plata recubiertas de almidón

$$m_{\text{pesada}} = 0.001478 \text{ g}$$

$$M_{\text{molar Ag}} = 107.87 \text{ g/mol}$$

$$M_{\text{molar AgNO}_3} = 169.87 \text{ g/mol}$$

$$m_{\text{Ag}} = \frac{M_{\text{molar Ag}} \times m_{\text{pesada}}}{M_{\text{molar AgNO}_3}} = 0.000938 \text{ g}$$

$$\rho_{\text{Ag}} = 10.490 \text{ g/cm}^3$$

$$r_{\text{AgNP}} = 7.5 \text{ nm} = 7.5 \times 10^{-7} \text{ cm}$$

$$V_{\text{AgNP}} = \left(\frac{4}{3}\right) \pi r^3 = 1.77 \times 10^{-18} \text{ cm}^3$$

$$m_{\text{AgNP}} = \rho_{\text{Ag}} \times V_{\text{AgNPs}} = 1.85 \times 10^{-17} \text{ g}$$

$$\text{Cantidad de AgNPs en 40 mL} = \frac{m_{\text{Ag}}}{m_{\text{AgNP}}} = 5.1 \times 10^{13}$$

$$\text{Cantidad de AgNPs en 1 mL} = 1.27 \times 10^{12}$$

$$\text{Cantidad de AgNPs en 1L} = 1.27 \times 10^{15}$$

$$N_A = 6.022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$$

$$\text{Concentración molar de AgNPs} = 2.11 \times 10^{-9} \text{ M}$$

(Esta es la concentración de nanopartículas en la solución madre).

$$\text{Abs}_{\text{AgNPs}} = \epsilon b C$$

La Figura 1 muestra el amplio rango lineal de la absorbancia con la concentración de nanopartículas determinándose el **coeficiente de absortividad molar en $9.28 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$** ($\approx 10^9$), lo cual se encuentra dentro de los valores esperados en comparación a los cálculos reportados para nanopartículas recubiertas de citrato siendo del mismo orden de magnitud (Tabla 1). Si bien el gráfico no pasa por (0,0), el valor determinado experimentalmente se encuentra muy cercano a este valor, por lo que es esperable que la diferencia surja de los errores comunes de la ley de Lambert-Beer asociados a las medidas a bajas concentraciones.

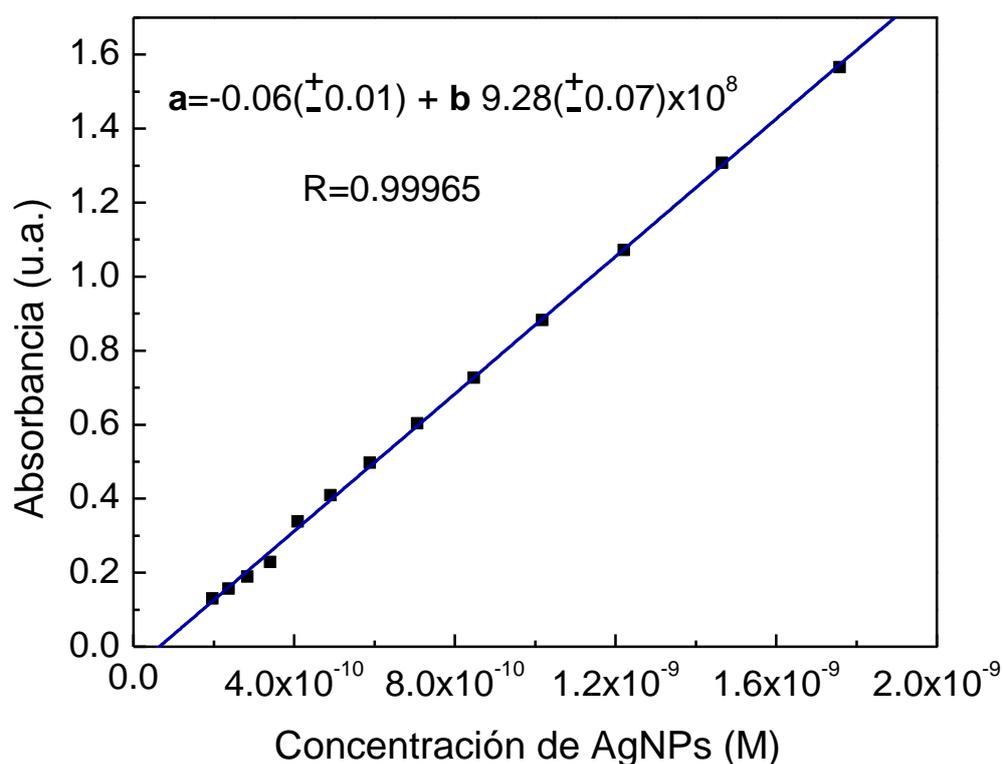


Figura 1: Gráfico de absorbancia vs. concentración de nanopartículas, empleado para determinar el coeficiente de absortividad molar de las nanopartículas.

Tabla 1 : Simulación de los coeficientes de extinción molar y de la posición de los máximos de absorción para nanopartículas recubiertas de citrato. Adaptado de referencia ¹.

d (nm)	λ_{\max} (nm)	ϵ ($M^{-1}cm^{-1} \times 10^8$)
10	392.1	5.56
20	400.8	41.8
30	405.6	145
40	412.3	336
50	420.9	537
60	431.5	739
70	443.8	941
80	458.3	1142
90	474.6	1344
100	492.8	1546

¹Paramelle, D. *et al.* A rapid method to estimate the concentration of citrate capped silver nanoparticles from UV-visible light spectra. *Analyst* **139**, 4855-4861 (2014).

ANEXO III

Presentaciones en congresos

- **2015** Mención especial por la presentación oral: Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata, para el desarrollo de un sensor colorimétrico de mercurio. Cuarto Encuentro Nacional de Química (ENAQUI).
- **2015** *Silver nanoparticles and its use for heavy metal detection. 4th Nano Today Conference* (Elsevier) .
- **2013** Estudio del poder estabilizante del almidón y su uso en el control de tamaño de las nanopartículas magnéticas de óxido de hierro. 2do. Congreso Interdisciplinario de Nanotecnología y Biomateriales.
- **2012** Evidencia de la formación de cloruro de plata como responsable de la agregación de nanopartículas. XX Congresso da Sociedade Iberoamericana de Electroquímica.
- **2012** *Thermodynamic study of the addition process of silver nanoparticles*. Seminario Internacional de Nanociencias y Nanotecnologías.
- **2011** Detección de metaborato en presencia de borohidruro por voltamperometría cíclica y espectrometría infrarroja. Reunión del Grupo de Electroquímica de la Real Sociedad Española de Química.
- **2011** Técnicas para la evaluación de la pureza del borohidruro de sodio . Segundo Encuentro Nacional de Ciencias Químicas (ENAQUI 2011).
- **2010** Estabilidad termodinámica de nanopartículas de plata frente al proceso de agregación . XXVIII Congreso Argentino de Química y 4º Workshop de Química Medicinal.
- **2009** Estudio para el control de la síntesis y estabilidad de nanopartículas metálicas de plata. XVII Jornadas de Jóvenes Investigadores de la AUGM.

ANEXO IV
Trabajos publicados



On the purity assessment of solid sodium borohydride

Santiago Botasini, Eduardo Méndez*

Laboratorio de Biomateriales, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Iguá 4225, 11400 Montevideo, Uruguay

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 August 2011

Received in revised form

19 September 2011

Accepted 20 September 2011

Available online 28 September 2011

Keywords:

Sodium borohydride

Fourier transformed infrared spectroscopy

Cyclic voltammetry

Sodium metaborate

ABSTRACT

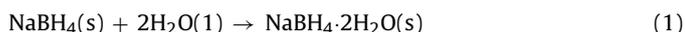
Since sodium borohydride has become extensively used as chemical hydrogen storage material in fuel cells, many techniques have been proposed to assess the purity of this substance. However, all of them are developed in aqueous media, where the reagent is unstable. In addition, its hygroscopic nature was difficult in any attempt to make precise quantifications. The present work compares three different methods, namely, voltammetric, titrimetric, and Fourier transformed infrared spectroscopy (FTIR) in order to assess the purity of sodium borohydride, using an expired and a new sodium borohydride samples as references. Our results show that only the FTIR measurements provide a simple and semi-quantitative means to assess the purity of sodium borohydride due to the fact that it is the only one that measures the sample in the solid state. A comparison between the experimental data and theoretical calculation reveals the identification of the absorption bands at 1437 cm^{-1} of sodium metaborate and 2291 cm^{-1} of sodium borohydride which represent a good fingerprint for the qualitative assessment of the sample quality.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Sodium borohydride is being extensively studied for chemical hydrogen storage and as a fuel in direct borohydride fuel cells (DBFC) [1,2]. Due to the high requirements of water in these cells, the use of solid sodium borohydride is a suitable option [3], and ideally, future DBFC might be stored and handled in a dry form. However, the instability of sodium borohydride in humid ambient constitutes a problem, and the formation of $\text{NaBO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ as a by-product retards water accessibility to NaBH_4 particles, and lowers the efficiency in H_2 production. In this context, the quality control of the purity state of sodium borohydride is on demand.

Sodium borohydride powder is highly hygroscopic both at ambient and steam temperatures [4]. Anhydrous NaBH_4 progressively reacts with water to yield sodium metaborate, $\text{NaBO}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, according to the following reactions [4–7]:



being the total reaction the sum of Eqs. (1)–(3):



where the number of water molecules, x , can vary depending on the temperature and the quantity of water present in the reacting system.

Water adsorption begins at 20% relative humidity at ambient temperature [8]. Under these conditions, isothermic microcalorimetric measurements display an exothermic peak, corresponding to the phase transformation from the anhydrous to the di-hydrate form (Eq. (1)). Above this level of water adsorption, the deliquescence process takes place (Eq. (2)), in which solid sodium borohydride dissolves in sorbed water [9]. The process ends with the full hydration of NaBH_4 , yielding sodium metaborate and gaseous hydrogen (Eq. (3)). *Ab initio* molecular dynamics near ambient temperature indicates that sorbed water penetrates into the (001) surface of NaBH_4 on a picoseconds time-scale [4]. This indicates that the deliquescence process constitutes the intermediate step towards the formation of sodium metaborate as the final product. In this regard, the chemical transformations produced due to the sorption of ambient humidity are irreversible, and therefore NaBH_4 is highly unstable towards hydrolysis, even under appropriate storage conditions. Depending on the humidity conditions, the whole process is observed in Eq. (4) or some intermediate degree of deterioration of the reagent can be seen in Eqs. (1)–(3).

Several analytical methods provide simple ways to monitor borohydride concentration in solution, including titrimetry with iodate or hypochlorite [10,11], open circuit potential measurements [12,13] and cyclic voltammetry [14]. All of these methods

* Corresponding author at: Laboratorio de Biomateriales, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Iguá 4225, 11400 Montevideo, Uruguay. Tel.: +598 25250749; fax: +598 25250749.

E-mail addresses: sbotasini@fcien.edu.uy (S. Botasini), emendez@fcien.edu.uy (E. Méndez).

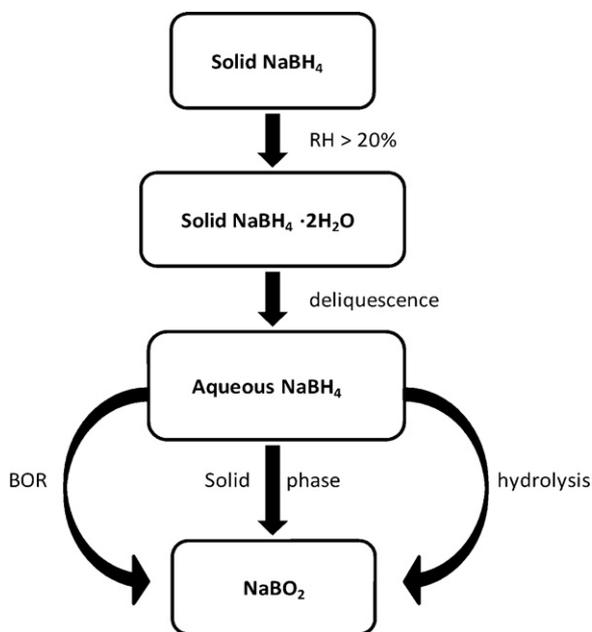
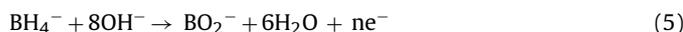


Fig. 1. Processes involving hydration of solid sodium borohydride.

follow the borohydride oxidation reaction (BOR), which under strong alkaline conditions ($\text{pH} > 12$) is:



Such alkaline condition slows down the competitive reactions of hydrolysis, which is strongly dependant on the electrode material [12]. Nevertheless the total number of exchanged electrons (n) reported for the BOR at high pH are generally lower than the expected value of 8 [13,15,16], indicating that the hydrolysis reaction cannot be completely disregarded. Moreover, it has been claimed that the presence of metaborate in the solution affects the voltammetric profile of the BOR [17].

As all the reported analytical methods described herein are carried out in aqueous media, the real state of solid sodium borohydride remains obscure, and none of them would be adequate for quality control purposes (Fig. 1). In this context, the need of a rapid tool to control the purity and storage conditions of sodium borohydride in view of its eventual future industrial use is desirable. In this work, we will show that Fourier transformed infrared (FTIR) measurements provide a simple semi-quantitative means to assess NaBH_4 purity. A comparison between well-established techniques provides the necessary background for a full discussion on the real possibility of assessing the purity of sodium borohydride.

2. Materials and methods

Solid sodium borohydride, NaBH_4 , CAS Number: 16940-66-2, was acquired from Aldrich (Product Code 45,288-2). According to the Lot analysis (LOT STBB1392), it is 98.8% pure, contained 0.52% MgCO_3 added as anti-caking agent, and the expiration date is March 2012. Other chemicals were, at minimum, reagent quality: sodium metaborate, $\text{NaBO}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} > 99\%$, from Aldrich; spectroscopic grade potassium bromide, KBr, from Pike Technologies; NaOH, 97%, from Anedra; sodium thiosulfate, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 99.5%, from Biopack; potassium iodide, KI $> 99.5\%$, from R. Benzo; potassium iodate, KIO_3 , 98%, from Aldrich. Water-sensitive reagents were stored at ambient temperature in a closed chamber at 20% RH maintained with concentrated sulfuric acid. Borohydride samples were dried in a conventional oven at 80°C during 24 h. All solutions were prepared

in MilliQ water. An expired sample of sodium borohydride (from Aldrich) was used for comparison.

Cyclic voltammetric experiments were performed using a conventional three-electrode arrangement composed of a BAS gold disc working electrode (0.3 cm diameter, 0.071 cm^2 geometric area), a graphite carbon lead as counter electrode, and a Schott saturated calomel reference electrode (SCE, $E = 0.244\text{ V-SHE}$ at 20°C). The gold electrode was polished with $0.05\ \mu\text{m}$ alumina slurry, followed by ultrasonication in ultrapure water, and finally rinsing with copious amounts of ultrapure water. The supporting electrolyte was 2 mol L^{-1} NaOH, and the borohydride solutions in the supporting electrolyte were prepared immediately before the measurements at concentrations between 0.5×10^{-3} and $10 \times 10^{-3}\text{ mol L}^{-1}$. All solutions were purged from oxygen by bubbling ultrapure nitrogen, and a nitrogen atmosphere was maintained over the solution during measurements. A Voltalab PGZ 301 computer-controlled potentiostat (Radiometer, Switzerland) was employed for total control of the experiments and data acquisition. Voltammograms were obtained by sweeping the working electrode potential from -0.90 V to 0 V at a scan rate of 0.1 V s^{-1} in quiescent solutions.

Iodate titrimetry was conducted based on a reported technique [11] on 25–35 mg sample of dried sodium borohydride, which was added to a previously mixed solution containing 25 mL of 0.5 mol L^{-1} NaOH and a standardized KIO_3 solution ca. 0.04 mol L^{-1} , and swirled for 30 s. This order in the reagent addition ensures minimal time exposure of sodium borohydride to the aqueous solution, minimizing hydrolysis reaction.

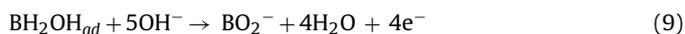
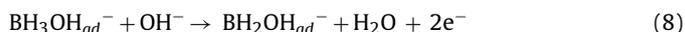
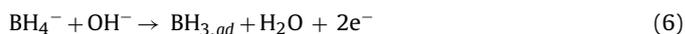
FTIR spectra in the range $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ were obtained at room temperature employing a Shimadzu infrared spectrometer model IR-Prestige 21, averaging 10 scans at a nominal resolution of 4 cm^{-1} and Happ–Genzel apodization. Dried samples were thoroughly mixed with KBr in an agate mortar, and 13 mm-discs were prepared in a Pike CrushIR at a pressure of 10 ton. For the design of the calibration curve, dried samples of NaBH_4 and $\text{NaBO}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ were accurately weighed and mixed with ca. 0.50 g KBr. The absorbance of the vibrational bands related to each compound was measured for the analytical studies.

Geometry optimization calculations were performed *in vacuo* using density functional theory (DFT)/B3LYP with the basis set 6-311++G (2df,2p) and Møller–Plesset perturbation theory at second order (MP2) with a basis set 6-311++G**. In both cases the starting point for the calculations was the molecule taken from the experimental synchrotron data obtained from Fachinformationszentrum Karlsruhe (76344 Eggenstein–Leopoldshafen, Germany, depository number CSD-419045) [18]. All calculations were performed with SPARTAN 08 software, and the unscaled calculated IR spectra were compared with the experimental results.

3. Results and discussion

3.1. Voltammetric determination of sodium borohydride

The BOR is a complex process involving, theoretically, a total exchange of 8 electrons. Recent *in situ* FTIR study of the BOR [19] agrees with the following mechanism:



According to the theory for an irreversible process [20], the current density (j_p) for the BOR varies linearly with the bulk concentration of sodium borohydride, $C_{BH_4}^*$:

$$j_p = 2.99 \times 10^5 \left[(1 - \alpha) n_a D_{BH_4^-} \nu \right]^{1/2} n C_{BH_4}^* \quad (10)$$

In order to calculate the theoretical value for the slope of Eq. (10), we employed data from Santos and Sequeira [21] closest to our experimental conditions: charge transfer coefficient for the oxidation step, $\alpha = 0.84$; total number of exchanged electrons, $n = 7.6$, and diffusion coefficient of borohydride anion $D_{BH_4^-} = 2.4 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. In addition, the number of electrons involved in the rate determining step, $n_a = 2$, can be deduced from the mechanism depicted in Eqs. (6)–(9) [19]. At a potential scan rate $\nu = 0.10 \text{ V s}^{-1}$, the value for the slope is $1.99 \text{ A L mol}^{-1}$. While the theoretical equation fits quite well with our experimental data (Fig. 4, dashed line), the polynomial equation of second order $j_p = 2.3479 C_{BH_4}^* - 0.03416 (C_{BH_4}^*)^2$ represents a better fit ($r^2 = 0.9994$) (Fig. 4, full line). Hence, the complexity of the BOR process affects the experimental determination of confident values for the current density, and the linearity predicted by Eq. (10) is not accomplished [21]. The determination carried out at concentration levels between 5×10^{-4} and $15 \times 10^{-3} \text{ M}$ employing the quadratic equation yielded a mean value for the purity of expired sodium borohydride of 86.3 mole% (range: 76.4–92.9%, $n = 5$).

One of the main flows in the electrochemical methods is the competition between the BOR and the hydrolysis, and the possible catalytic effect of the anode material [12,21]. In addition, the heterogeneous processes taking place on the electrode surface by the reaction intermediates give rise mutually superimposed faradic currents, which affect the reliability of the main current peak [22]. Therefore, the main current peak related to the BOR cannot be taken as an additive property, and fails as analytical signal. The high dispersion of the voltammetric determination is a confirmation of such lack of reliability.

3.2. Titrimetric determination of sodium borohydride

The iodate method is the analytical methodology considered as the reference, and despite being more than 50 years old and with several pitfalls, has not been substituted with other method with more efficient. In the original work [11] the authors show that even at the highest pH assayed, borohydride hydrolysis is not completely avoided. This becomes a problem in connection with iodate titrimetry, a volumetric technique quite length. The determination carried out on expired sodium borohydride samples yield a mean value for the purity of 82.8% w w^{-1} (range: 75.0–89.1%, $n = 6$). On the other hand, the same analytical procedure carried out on the recently opened sodium borohydride yields a value for the purity of 93.2% w w^{-1} (range: 91.4–94.8%, $n = 5$).

One of the advantages of this method is that the purity is expressed over the total mass weighted so no calibration curve is needed. However, face the problems of the well-known difficulties related to iodine-based methods [11], which requires extensive precautions to render it quantitatively precise. Like in the electrochemical methods the reagent intrinsic instability in aqueous media may produce unreliable analytical results. Though alkaline media retard the hydrolysis process, it is not completely avoided. In addition, hydrogen gas liberated in the decomposition process Eq. (10), may have as a consequence of an overestimate of the purity of the sample. Given that the purity is expressed as the mass of borohydride over the total of mass of weighed sample, the purity assessed does not provide direct information of the decomposition of borohydride into metaborate, and may also include hydration

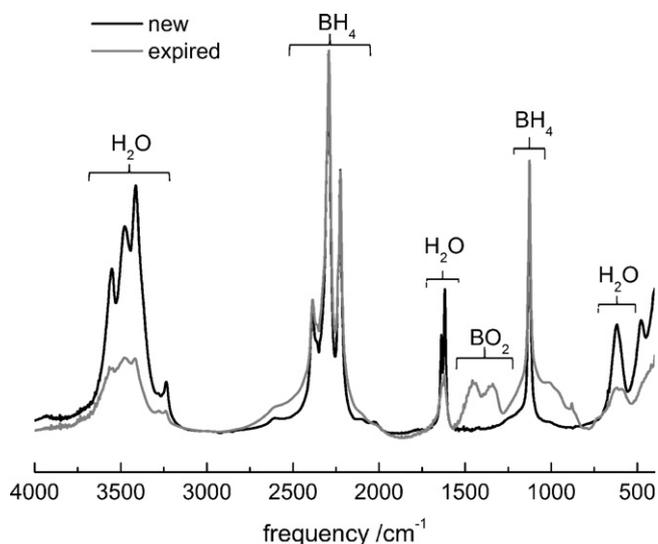


Fig. 2. FTIR spectra of new (recently opened borohydride) (black) and expired (grey) NaBH_4 normalized by assigning a value of 1.00 to the vibrational band at 2291 cm^{-1} .

water as impurity. Notice that for the recently opened reagent, the declared purity by the dealer was 98.8%, and our value obtained by titrimetry was 93.2%. This 5.6% difference may be ascribed to crystallization water, as we will show later.

3.3. Experimental FTIR spectra

The FTIR spectra of NaBH_4 samples (Fig. 2) are composed by well defined bands, in which it is worth to mention their quality in terms sharpness and definition. Such an improvement can be attributed to the absence of liquid water produced by the deliquescence process that is usually reflected in smoothed spectra. Therefore, sample drying improves the quality (see Fig. 2, Appendix C).

Five groups of bands are clearly distinguished in the experimental FTIR spectra of the recently opened borohydride sample (Fig. 2, black line). Two of them correspond to NaBH_4 signals, and the others to the H_2O crystallization molecules. The appearance of the unexpected H_2O crystallization bands in the recently opened NaBH_4 , strongly suggest that the NaBH_4 is either already partially hydrated (before opened) or is rapidly altered during the measuring process. In any case the borohydride sample should be considered as a mixture of NaBH_4 and $\text{NaBH}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (global formula $\text{NaBH}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$), although the actual amount of $\text{NaBH}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ cannot be determined. This compromise all the analytical methods based on the use of a calibration curve.

In order to fill some gaps found in the interpretation of the infrared spectra of sodium borohydride, the experimental data was compared with the calculated FTIR for $\text{NaBH}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Table 2). The O–H stretching region reveals three sharp bands at 3414, 3478 and 3553 cm^{-1} , and a low intensity sharp band at 3237 cm^{-1} that is due to the formation of a di-hydrogen bond between water and NaBH_4 [18]. Two partially superimposed bands at 1618 and 1638 cm^{-1} correspond to H–O–H bending, again suggesting that both water molecules interact differently with NaBH_4 . Finally, the librational modes of the water molecules are observed at 478 and 617 cm^{-1} , while the four scissoring bands together with the wagging band of BH_4 define one single peak at 1126 cm^{-1} . The absence of splitting in this band is indicative of an undistorted tetrahedral symmetry of the borohydride group. The stretching modes of BH_4 group give rise to three well-distinguished and sharp bands at 2224, 2291 and 2386 cm^{-1} , and a small contribution at 2594 cm^{-1} . The first three bands correspond to a mixture of stretching modes involving different hydrogen atoms of the BH_4 moiety, and the latter band

Table 1

FTIR vibrational bands (in cm^{-1}) for recently opened and expired solid sodium borohydride. The shaded area corresponds to borohydride vibrational bands.

NaBH ₄ (new)		NaBH ₄ (expired)	
Frequency (cm^{-1})	Normalized absorbance	Frequency (cm^{-1})	Normalized absorbance
478	0.30	478 ^a	0.13
617	0.29	617	0.12
		880 ^b	0.09
		1018 ^b	0.14
1126	0.72	1126	0.72
		1339 ^b	0.14
		1437 ^b	0.14
1618	0.38	1618	0.16
1638	0.26	1638 ^a	0.13
2224	0.69	2224	0.69
2291	1.00	2291	1.00
2386	0.33	2386	0.35
2594	0.04	2594	0.07
3237	0.13	3240	0.07
		3279	0.08
3414	0.64	3420	0.21
3478	0.54	3474	0.21
3553	0.43	3564	0.18

^a Shoulder.

^b Sodium metaborate bands.

at 2594 cm^{-1} corresponds to the single stretching mode of B–H₃ (Table 2). Nevertheless, it was also noticed that the normalized absorbance at 2594 cm^{-1} (Table 1), differs between the new and the expired NaBH₄, while the others bands assigned to the borohydride molecule do not. The difference was attributed to the small contribution of metaborate absorption (Fig. 3a).

The FTIR spectra of expired sodium borohydride (Fig. 2, grey line) essentially display the same features of the recently opened reactive (Table 1). Comparison between the vibrational spectra (Fig. 3a) of pure NaBO₂·4H₂O (black) and expired NaBH₄ (grey) clearly demonstrates that the new vibrational bands at 880 cm^{-1} , 1018 cm^{-1} , 1339 cm^{-1} and 1437 cm^{-1} appear due to NaBO₂·4H₂O, formed through Eq. (3) (vide supra). The first two bands can be assigned to the stretching mode while the last two are assigned to the B–O–H bending mode [23]. This confirms why they do only appear in the expired sodium borohydride sample, where NaBO₂ is present. Both the linear combination of pure borohydride and metaborate spectra (Fig. 3b) and the similarities in the

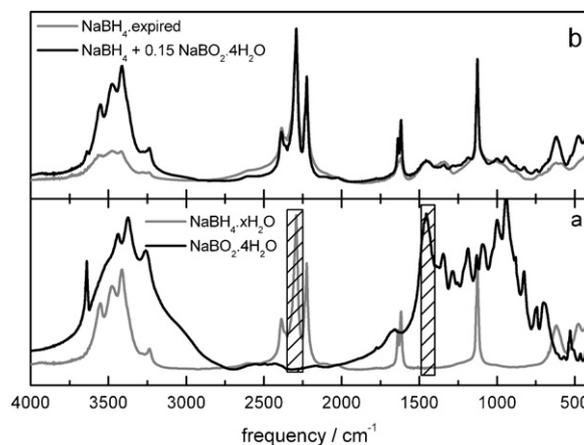


Fig. 3. (a) FTIR spectra of NaBH₄ (grey) and NaBO₂·4H₂O (black). The shaded areas represent the vibrational bands for NaBH₄ (2291 cm^{-1}) and NaBO₂·4H₂O (1437 cm^{-1}) for which there is no mutual interference between both spectra. (b) Experimental FTIR spectra of expired NaBH₄ (grey) and simulation obtained by linear combination of NaBH₄ and NaBO₂·4H₂O spectra in 1:0.15 proportion, respectively (black).

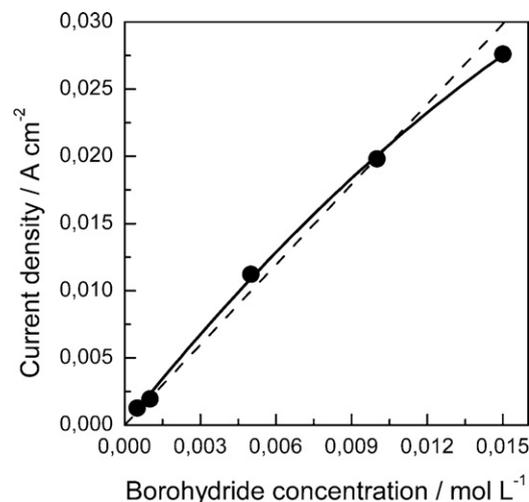


Fig. 4. Calibration curve for the voltammetric determination of sodium borohydride.

Table 2

Unscaled vibrational bands position (in cm^{-1}) for sodium borohydride di-hydrate calculated at different levels of theory, and compared to the experimental spectra.

Experimental spectra NaBH ₄ ·xH ₂ O	Theoretical calculations			Assignments ^b
	B3LYP 6-311++G(2df,2p)	Møller Plesset MP2 6-311++G**		
478	487	438		BH ₄ rocking + OH libration from H ₂ O(1) and (2) OH libration OH from H ₂ O(2) Assym. twisting H ₂ O(2)
617	645	633		
	756	679		
	1083	1142		BH ₄ wagging
	1130	1168		BH ₄ scissoring
1126	1180	1217		BH ₄ scissoring
	1232	1295		BH ₄ scissoring
	1302	1325		BH ₄ scissoring
1618	1621	1618		Bending H ₂ O(1)
1638	1665	1673		Bending H ₂ O(2)
2224	2239	2303		Stretching B–H ₁ + B–H ₄
2291	2257	2317		Asymmetric stretching B–H ₂ (B–H ₁ + B–H ₄) ^a
2386	2274	2327		Symmetric stretching B–H ₄ (B–H ₁ + B–H ₂) ^a
2594	2505	2568		Stretching B–H ₃
3237	3294	3593		Stretching O(2)–H _{w3}
3414	3692	3795		Stretching O(1)–H _{w1}
3478	3877	3941		Stretching O(2)–H _{w4}
3553	3903	3971		Stretching O(1)–H _{w2}

^a In parenthesis the additional contributions of other stretching modes predicted only by B3LYP/6-311++G(2df,2p).

^b See Fig. B1 in Appendix B of supplementary data for borohydride di-hydrate atom numbering.

Table 3
Summary table of the results and the advantages and disadvantages of each method.

Technique	Assessment of the purity	Advantages	Disadvantages
Voltammetry	86.3 mole% (range: 76.4–92.9%, $n = 5$).	<ul style="list-style-type: none"> • High sensitivity • Although the purity is expressed as the ratio between the NaBH_4 and NaBO_2, the presence of electro active impurities can be detected 	<ul style="list-style-type: none"> • Competition between the BOR and the hydrolysis • Possible catalytic effect of the anode material • Requires a calibration curve • Slow technique • The purity is expressed as the ratio between the NaBH_4 and NaBO_2
Iodometry	82.8% w w^{-1} (range: 75.0–89.1%, $n = 6$)	<ul style="list-style-type: none"> • Calibration curve is not required • The purity is expressed over the mass weighted thus it takes into account others impurities apart from NaBO_2 	<ul style="list-style-type: none"> • Slow technique • The instability of NaBH_4 in aqueous solutions
FTIR	81 mole% (range: 78–83%, $n = 5$).	<ul style="list-style-type: none"> • Fast technique • Measurements are carried out directly on the solid sample • Although the purity is expressed as the ratio between the NaBH_4 and NaBO_2, the presence of infrared visible impurities can be detected 	<ul style="list-style-type: none"> • Requires a calibration curve • The purity is expressed only as the ratio between the NaBH_4 and NaBO_2

spectra of the expired sodium borohydride and of the recently opened sample left under severe humidity condition for some hours, confirms that the new vibrational bands in the expired sample are due to the hydrolysis of NaBH_4 to form $\text{NaBO}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (see Fig. C.1, Appendix C).

Given that the bands at 1437 cm^{-1} of sodium metaborate and 2291 cm^{-1} of sodium borohydride (Fig. 3a) do not overlap, both signals represent a good fingerprint for the qualitative assessment of the quality of sodium borohydride. The attempt to use these bands for quantitative purposes should consider the ratio between the measured absorbance of both peaks and the assumption of the accomplishment of the Lambert–Beer law (see Appendix A):

$$\frac{A_{1437}}{A_{2291}} = \frac{\varepsilon_{1437}}{\varepsilon_{2291}} \left(\frac{1 - f_{\text{NaBH}_4}}{f_{\text{NaBH}_4}} \right) \quad (11)$$

where f_{NaBH_4} is the molar fraction of sodium borohydride in the sample. Experimental data in the lower concentration range adjusted to Eq. (11) fits with a slope $\varepsilon_{1437}/\varepsilon_{2291} = 0.54 \pm 0.03$ (Fig. 5), yielding a purity of the expired sample of sodium borohydride of 81 mole% (range: 78–83%, $n = 5$). The non linearity observed in Fig. 5 for values above 0.8 molar fraction ratio could be attributed to deviations from Lambert–Beer law at high concentrations.

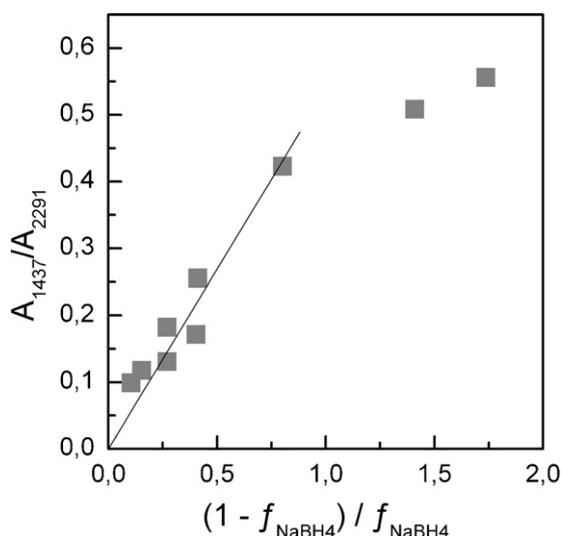


Fig. 5. Calibration curve for the quantification of NaBH_4 in the samples by FTIR, according to Eq. (11).

As discussed above this procedure is based on a calibration curve, therefore the calculated results can slightly differ from the real value. Despite of that, unlike other methods, FTIR methodology is the only one which assesses the purity of sodium borohydride in the solid state, so problems related to the BOR and hydrolysis process are avoided. Moreover, FTIR spectra can be effectively used as a positive–negative assay for the presence of metaborate.

Table 3 summarizes all the results together with the advantages and disadvantages of each method. The analysis of the combined results give rise to a more complete picture of the actual state of solid sodium borohydride, and all data should be taken as complementary. For example, from iodate titrimetry we know that sodium borohydride represent 93.2% of the total mass of the newly open reagent, and in combination with FTIR, we know that the rest is mainly water. This water uptake of ca. 6% is in accordance [8] with the rate of water uptake during the time usually spent in the laboratory ($\text{RH} < 40\%$) in the confection of the KBr disks. From FTIR spectrum, we notice that this amount of adsorbed water did not yield detectable amounts of sodium metaborate, suggesting that the reagent is in the first step of the deterioration process (Eq. (1)). In the case of the expired sample, the purity obtained by titrimetry was 82.8%, indicating that the level of impurities has dramatically increased. FTIR measurements indicate that H_2O and NaBO_2 are present, and the level of deterioration of the reagent achieved the level represented by Eqs. (3) and (4). The presence of sodium metaborate seems not to affect the lack of linearity in the voltammetric determination of borohydride anion; are the ad-species formed during the BOR the responsible for the incomplete number of electrons exchanged.

4. Conclusions

We propose FTIR as a simple method for the assessment of the purity of sodium borohydride. Contrary to voltammetry and titrimetry, the present one is carried out directly on the solid sample, avoiding the interference of the hydrolysis and oxidation processes that take place in aqueous solutions. A precautionary note is that NaBH_4 is highly hygroscopic, and so whatever technique is employed one should keep the samples dry, and/or account for adsorbed moisture. Theoretical calculations help to confirm that the two most useful vibrational frequencies are 1437 and 2291 cm^{-1} for BO_2 and BH_4 respectively which are used for the semi-quantitative analysis of the sample. The simplicity and rapidness of the method constitutes an additional and welcomed advantage for quality control purposes.

Acknowledgments

This work was supported by PEDECIBA (PNUD/URU/97/016) and CSIC (UdelaR). S.B. acknowledges PEDECIBA–Química for granting a fellowship. E.M. is a PEDECIBA and ANII researcher. Laboratorio de Biomateriales belongs to the Centro Interdisciplinario en Nanotecnología, Química y Física de Materiales, Espacios Interdisciplinarios, UdelaR.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.jpowsour.2011.09.055](https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2011.09.055).

References

- [1] J. Ma, N.A. Choudhury, Y. Sahai, *Renew. Sust. Energ. Rev.* 14 (2010) 183–199.
- [2] C.P. de Leon, F.C. Walsh, D. Pletcher, D.J. Browning, J.B. Lakeman, *J. Power Sources* 155 (2006) 172–181.
- [3] E.Y. Marrero-Alfonso, J.R. Gray, T.A. Davis, M.A. Matthews, *Int. J. Hydrogen Energ.* 32 (2007) 4723–4730.
- [4] A.M. Beaird, T.A. Davis, M.A. Matthews, *Ind. Eng. Chem. Res.* 49 (2010) 9596–9599.
- [5] R. Retnamma, A.Q. Novais, C.M. Rangel, *Int. J. Hydrogen Energ.* 36 (2011) 9772–9790.
- [6] S. Bennici, A. Garron, A. Auroux, *Int. J. Hydrogen Energ.* 35 (2010) 8621–8625.
- [7] B.H. Liu, Z.P. Li, *J. Power Sources* 187 (2009) 527–534.
- [8] M. Murtomaa, E. Laine, J. Salonen, O. Kuusinen, *Powder Handl. Process* 11 (1999) 87–90.
- [9] A.M. Beaird, E.Y. Marrero-Alfonso, T.A. Davis, M.A. Matthews, *AIChE 100-2008 AIChE Annual Meeting, Conference Proceedings*, Philadelphia, PA, 2008.
- [10] S.W. Chaikin, *Anal. Chem.* 25 (1953) 831–832.
- [11] D.A. Lytle, E.H. Jensen, W.A. Struck, *Anal. Chem.* 24 (1952) 1843–1844.
- [12] D.M.F. Santos, C.A.C. Sequeira, *J. Electroanal. Chem.* 627 (2009) 1–8.
- [13] S.C. Amendola, P. Onnerud, M.T. Kelly, P.J. Petillo, S.L. Sharp-Goldman, M. Binder, *J. Power Sources* 84 (1999) 130–133.
- [14] M.V. Mirkin, A.J. Bard, *Anal. Chem.* 63 (1991) 532–533.
- [15] E. Gyenge, *Electrochim. Acta* 49 (2004) 965–978.
- [16] G. Denuault, M.V. Mirkin, A.J. Bard, *J. Electroanal. Chem.* 308 (1991) 27–38.
- [17] S. Colominas, J. McLaerty, D.D. Macdonald, *Electrochim. Acta* 54 (2009) 3575–3579.
- [18] Y. Filinchuk, H. Hagemann, *Eur. J. Inorg. Chem.* (2008) 3127–3133.
- [19] B. Molina Concha, M. Chatenet, *Electrochim. Acta* 54 (2009) 6119–6129.
- [20] J. González Velasco, *Electroanalysis* 9 (1997) 880–882.
- [21] D.M.F. Santos, C.A.C. Sequeira, *Electrochim. Acta* 55 (2010) 6775–6781.
- [22] J. Hannauer, U.B. Demirci, C. Geantet, J.M. Herrmann, P. Miele, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 13 (2011) 3809–3818.
- [23] L. Jun, X. Shuping, G. Shiyang, *Spectrochim. Acta A* 51 (1995) 519–532.

Silver nanoparticle aggregation not triggered by an ionic strength mechanism

Santiago Botasini · Eduardo Méndez

Received: 10 August 2012 / Accepted: 16 February 2013 / Published online: 2 March 2013
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2013

Abstract The synthesis of stable colloidal solutions of silver nanoparticles is a major goal in the industry to control their fate in aqueous solutions. The present work studies 10–20-nm silver nanoparticle aggregation triggered by the presence of chloride ions. The aggregation process was followed by UV–Vis–NIR spectroscopy and transmission electron microscopy. We found that the mechanism involved differs from the classic explanation of nanoparticle aggregation triggered by an increase in the ionic strength. Moreover, our results give evidence that even when nanoparticles are resistant to an increment of the total amount of ions, the formation of insoluble salts in the vicinity of the nanoparticle is enough to induce the aggregation. The presence of silver chloride around the silver nanoparticles was documented by an X-ray diffraction pattern and electrochemical methods because chloride anions are ubiquitous in real media; this alternative process jeopardized the development of many applications with silver nanoparticles that depend on the use of stable colloids.

Keywords Nanoparticles · Aggregation · Silver · Sodium chloride · Starch

Introduction

In the past few years, silver nanoparticles (AgNPs) have been the subject of many studies due to the current applications especially in the cosmetic industry (Quadros and Marr 2011) as antimicrobial agents and in the analytical field as colorimetric sensors (Botasini et al. 2011; Hebeish et al. 2011; Huang et al. 2011; Mirzajani et al. 2011; Sharma et al. 2009; Vimala et al. 2009). It has been established that the bactericidal action relies on the toxic effect of free Ag(I) ions liberated by oxidation with dissolved oxygen (Beer et al. 2012; Liu and Hurt 2010; Liu et al. 2010; Xiu et al. 2011; Zhang et al. 2011). Alternatively, the design of sensors needs stable and sensitive nanoparticles to selectively react with the analyte of interest. Therefore, the analysis of the stabilization of the colloidal nanoparticle solutions is essential to the development of applications as well as to contribute to the prevention of undesirable toxic effects once the nanoparticles enter in the organism (Arvizo et al. 2012; Chaloupka et al. 2010; Stebounova et al. 2011) or the ambient (Chinnapongse et al. 2011; Levard et al. 2012). Although there are several works that study the aggregation process of AgNPs in simpler aqueous solutions focusing on the effect of ionic strength and pH (Piccapietra et al. 2012;

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s11051-013-1526-4) contains supplementary material, which is available to authorized users.

S. Botasini · E. Méndez (✉)
Laboratorio de Biomateriales, Instituto de Química
Biológica, Universidad de la República, Iguá 4225,
CP 11400 Montevideo, Uruguay
e-mail: emendez@fcien.edu.uy

Prathna et al. 2011; Saini et al. 2011; Singh et al. 2009), only a few authors highlight the importance of the electrolyte anion nature in the aggregation process (El-Badawy et al. 2010; Gang et al. 2005; Jiang and Yu 2008; Liu et al. 2010). Jiang and Yu (2008) experimented with different salts and found that triangular AgNPs aggregate selectively in the presence of anions capable of forming insoluble silver salts, though the experimental evidence on its identification and the mechanism involved in the aggregation process is still lacking (Jiang and Yu 2008; Li and Zhu 2006; Li et al. 2012; Liu et al. 2010). Thus, to the well-known aggregation mechanism based on colloidal instability produced by an increase in ionic strength, another mechanism not triggered by such an effect, but depending on chemical affinity, can be envisaged.

The objectives of the present work are twofold: (i) to present new evidence on the formation of AgCl around AgNPs in chloride medium and (ii) to show the role of such salt formation as the main responsible mechanism for AgNPs aggregation and provide alternatives for its prevention.

Materials and methods

All chemicals used were analytical reagent grade: silver nitrate (AgNO_3 , 99 %, Biopack), sulfuric acid (H_2SO_4 , 95.0–98.0 %, Biopack), nitric acid (HNO_3 , 69.0–71.0 %, Biopack), sodium chloride (NaCl , 99 %, Anedra), sodium hydroxide (NaOH , 97 %, Cicarely), sodium borohydride (NaBH_4 , 98 %, Sigma), soluble starch (reagent grade, Mallinckrodt), sodium fluoride (NaF , 99 %, J.T. Baker), sodium nitrate (NaNO_3 , 99.5 % Sigma–Aldrich), and sodium bromide (NaBr , 99 % Carlo Erba). Solid sodium borohydride was previously checked by Fourier Transformed Infrared Spectroscopy (Botasini and Méndez 2012) in order to assess its purity and the absence of sodium metaborate that may compete with other anions in solution.

All solutions were prepared with ultrapure water (resistivity $>18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$). Glassware was rigorously cleaned with a 1:1 (v/v) mixture of concentrated H_2SO_4 and HNO_3 followed by thorough rinsing with ultrapure water.

The synthesis of starch-capped AgNPs was carried out according to the literature methods with minor modifications (Vigneshwaran et al. 2006). An aqueous dispersion was prepared by adding 3 mL of a 0.1 M

AgNO_3 solution to about 200 mL of 0.20 % (w/w) aqueous solution of soluble starch followed by stirring to insure homogeneity. Next, 6 mL of freshly prepared 0.1 M NaBH_4 was added all at once and stirred for ca. 30 min. The solution was filtered to remove the excess starch and stored at room temperature. The synthesis of NaBH_4 -capped nanoparticles for the electrochemical analysis was carried out according to the literature (Mulfinger et al. 2007).

Carbon leads were incubated for 24 h in a solution containing AgNPs and used as working electrodes. The electrochemical system was completed with a high area graphite carbon lead as the auxiliary electrode and a saturated calomel as the reference electrode (SCE, $E = 0.244 \text{ V-SHE}$ at 20°C). The supporting electrolyte was a 1 M NaCl solution.

Electronic spectra were recorded at room temperature with a UV–Vis–NIR Shimadzu UV-1603 spectrophotometer. Samples for Transmission Electron Microscopy (TEM) were examined with a JEOL Microscope JEM model 1010 with acceleration voltage of 100 kV, after dripping 10 μL of AgNPs dispersion onto a carbon-coated copper grid, and air dried at room temperature. X-ray diffraction (XRD) studies were carried out with a Philips PW3710 diffractometer using $\text{Cu K}\alpha$ radiation. Samples were prepared by dripping 20 μL of concentrated AgNPs dispersion onto a glass slide.

Results and discussion

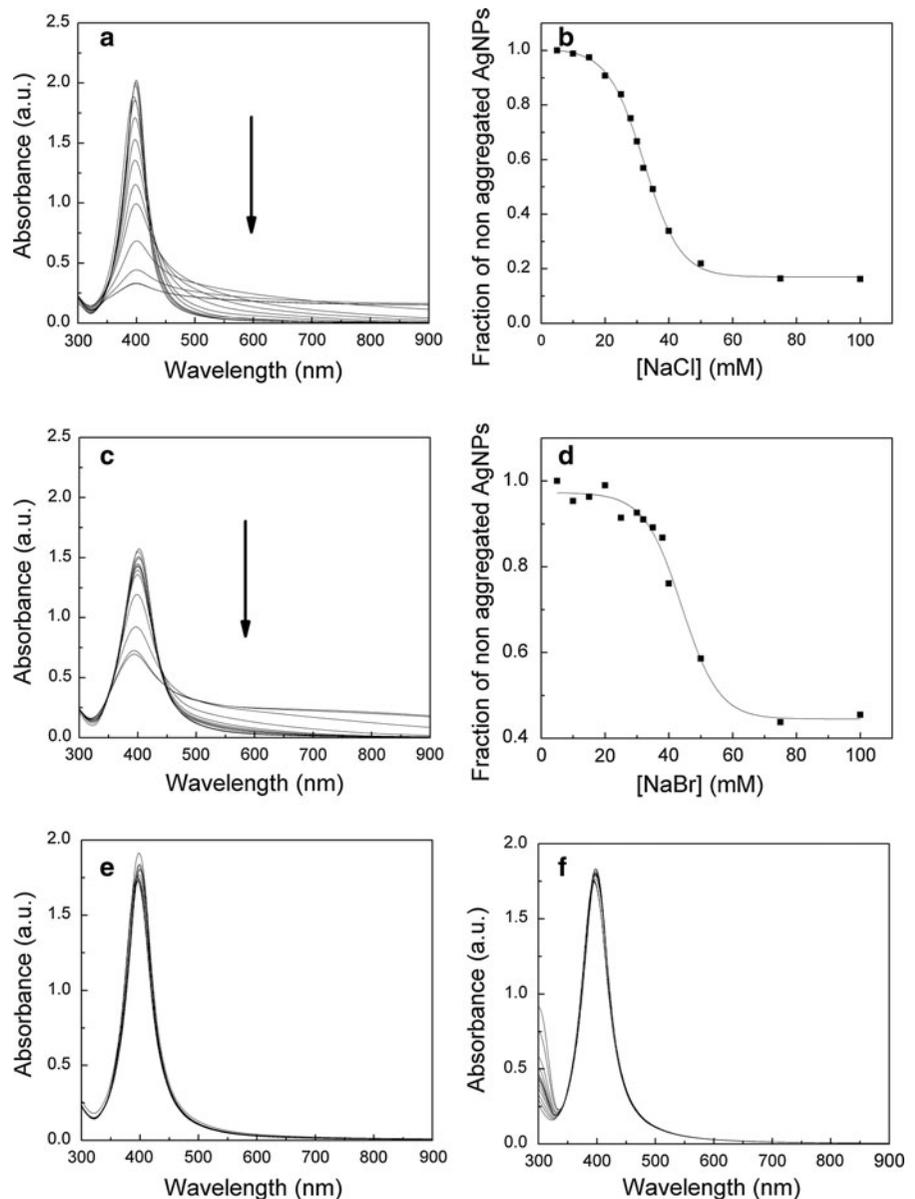
The synthesis of the starch-capped AgNPs yields quasi-spherical nanoparticles with a major population between 10 and 20 nm in diameter (Fig. 1 in Electronic Supplementary Material). Among the different capping agents that we may have selected for this work, there are many reasons to choose starch. It is cheap, environmentally and biologically friendly (Raveendran et al. 2003; Vigneshwaran et al. 2006), and its size and 3D network-like structure give the adequate physicochemical surroundings that illustrate the differential behavior observed in the presence of the different halides assayed (Fig. 1), compared to AOT-capped AgNPs (Fig. 2 in Electronic Supplementary Material). It is relevant to highlight that such differential behavior of starch can be addressed to the protection stability mechanism. It has already been reported (Prathna et al. 2011) that steric or

electrosterical protection provides better stability than single electrostatic stability. Unlike NaAOT, starch is clearly a huge molecule loaded with several hydroxyl groups and therefore acts as both electrostatic and steric protector. The UV–Vis–NIR spectra for the starch-capped AgNPs (Fig. 1a and c) show a reduction of the absorbance at ca. 400 nm concomitant with an increase in the absorbance at 800 nm with NaCl and NaBr rising concentrations. This indicates the formation of aggregates as revealed by the TEM images (Fig. 2). However, an equivalent concentration of both

NaF and NaNO₃ (Fig. 1e and f) does not produce any change in the nanoparticle absorbances, which indicates the prevention of aggregate formation in these electrolytes. Therefore, the aggregation process must be somehow related with the chemical nature of the anion.

It has been reported that non-spherical AgNPs exhibit a shift in their surface plasmon resonance peak position only in the presence of ions capable of producing insoluble salts with Ag(I) ions. However, such an effect was not observed in spherical AgNPs

Fig. 1 UV–Vis–NIR spectra of starch-capped AgNP dispersions with increasing concentrations of NaCl (a) and NaBr (c). Fraction of non-aggregated AgNPs vs. concentration of NaCl (b) and NaBr (d). The fraction was calculated by normalizing the absorbance at 400 nm. UV–Vis–NIR spectra for increasing concentrations of NaF (e) and NaNO₃ (f)



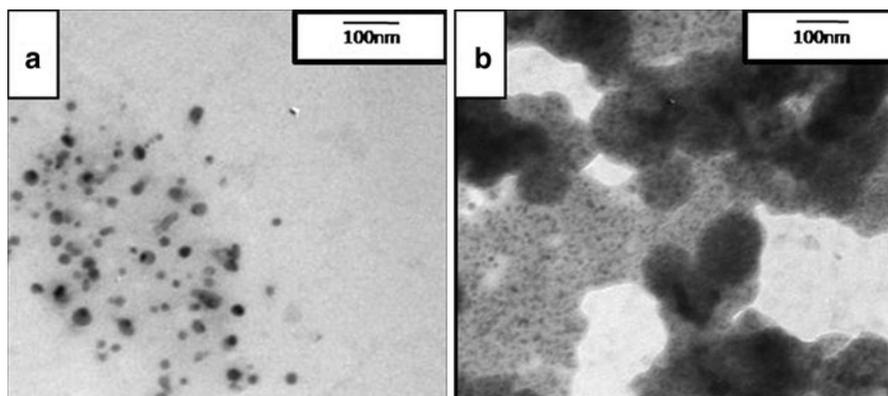


Fig. 2 TEM images of starch-capped AgNPs in the absence (a) and presence (b) of 100 mM NaCl concentration

for chloride concentrations in the micromolar range (Jiang and Yu 2008), indicating that the aggregation phenomenon is dependent not only on the identity of the anion but also on its concentration. The sigmoidal profiles of the aggregation process for increasing concentrations of NaCl (Fig. 1b) and NaBr (Fig. 1d) give a quantitative account for such dependence.

In our experimental conditions (chloride concentration in the millimolar range), the XRD pattern supports the formation of crystalline AgCl on AgNPs (Fig. 3) as deduced from the simultaneous presence of the peaks at 27.9 and 32.3° which correspond to the (111) and (200) diffraction planes of face-centered cubic AgCl (JCPDS 31-1238) (Wang et al. 2009; Zayat et al. 1997). Additionally, diffraction peaks at 38.3, 44.5, and 64.8° are assigned to (111), (200), and (220) planes of face-centered cubic Ag (JCPDS4-0783), respectively (Wang et al. 2009; Zayat et al. 1997). The peak at 31.8° is assigned to the (200)

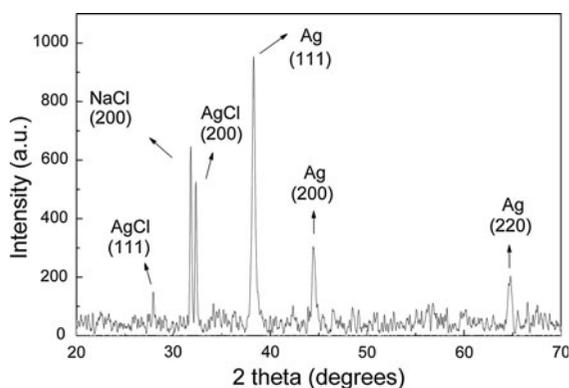


Fig. 3 X-ray diffraction pattern of starch-capped AgNPs aggregated in 100 mM NaCl solution

crystalline plane of sodium chloride which was used to induce the aggregation.

The average Ag and AgCl crystallite sizes estimated from the width of the XRD peaks using the Debye–Scherrer method are 5 and 8 nm, respectively. Such reductions in size are in agreement with the idea of the AgNPs' dissolution with the concomitant formation of AgCl crystallites. No aggregation was observed at pH 14 (Fig. 4). As hydroxyl groups effectively compete with chloride anions for Ag(I) ions (Singh et al. 2009), it is expected that the presence of OH⁻ ions favors the formation of Ag₂O and hence reduces the amount of free Ag(I) cations available to react with NaCl. These results support the idea that the formation of AgCl is the responsible for AgNPs aggregation.

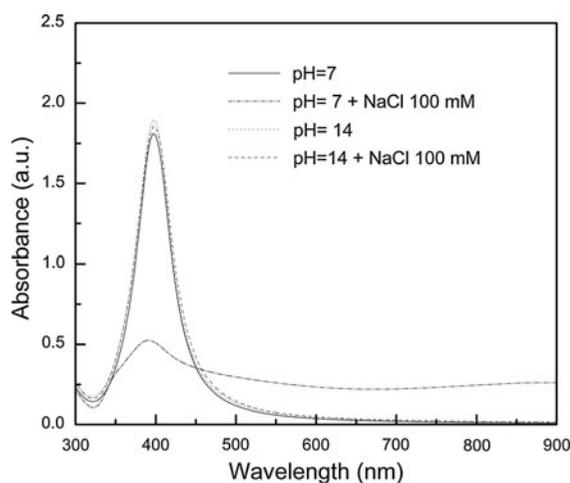
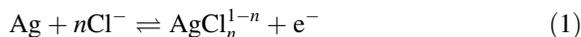


Fig. 4 UV-Vis-NIR spectra of starch-capped AgNPs at pH 7 (solid), pH 7 and 100 mM NaCl (dash dot), pH 14 (dot), and pH 14 and 100 mM of NaCl (dash)

In order to understand the chemical effect of chloride anions on the AgNPs, the latter were isolated onto a graphite lead and immersed in non-deaerated 1 M NaCl solution. As starch-capped AgNPs do not properly adhere to the graphite electrode, we used NaBH₄ as both the reducing and capping agent instead. The comparison between Fig. 5c and d shows the presence of small bright spots which correspond to the adhesion of AgNPs. It is worth mentioning that the physical deposition is aided by the surface roughness of the graphite electrode that provides pores and sites for the nanoparticles' anchorage. The voltammetric profile for the first negative-going scan from 0 to -0.25 V shows a cathodic contribution centered at -0.11 V (Fig. 5a) which is assigned to the reduction of adsorbed AgCl to Ag(0).

In another experiment, the voltammetric profile for the first positive-going scan starting at 0 V to the upper potential limit of 0.9 V (Fig. 6a) displays two anodic processes, both assigned to the dissolution of AgNPs, taking place in two stages. The first stage can be divided into three contributions (Fig. 6b), the first coming from the crystalline AgCl deduced from XRD experiments (I) and the last two coming from the chloride compounds of the general formula AgCl_n¹⁻ⁿ (Lampre et al. 2000; Liu et al. 2012) derived from the

oxidation of AgNPs to Ag(I) in the presence of 1 M NaCl:



The width at half height for the deconvoluted anodic voltammetric peaks is lower than the expected value for an adsorbed redox process (ca. 60 mV, irreversible 1e exchange), but it is in agreement with the voltammetric behavior of a thin film (Bard and Faulkner 2001), reinforcing the idea of the formation of a surrounded structure rather than a bulky nanoparticle undergoing a solid-state phase transformation (Singh et al. 2012).

Therefore, the chloride compounds formed remain adsorbed on the surface of the AgNPs. Among the different chloride compounds, one corresponds to the ionic pair AgCl ($n = 1$) (II) and the other to AgCl₂⁻ ($n = 2$) (III), in agreement with the speciation diagram at 1 M NaCl concentration (Fig. 3 in Electronic Supplementary Material). It has been recently reported that in aqueous solutions, AgCl exists as the complex AgCl(H₂O)₂, while AgCl₂⁻ is not bound to any water molecules (Liu et al. 2012). Hence, we expect a small difference between the electrode potential for both complexes (Fig. 6b). Additionally, with the exception of crystalline AgCl, the other

Fig. 5 Voltammetric profiles at a scan rate of 0.1 V s⁻¹ of AgNPs deposited onto graphite electrode. Cathodic sweep from 0 to -0.25 V (a); positive-going scan starting at 0 V to the upper potential limit of 0.9 V (b). TEM images of graphite electrode showing the presence (c) and absence (d) (for comparison) of silver nanoparticle deposits

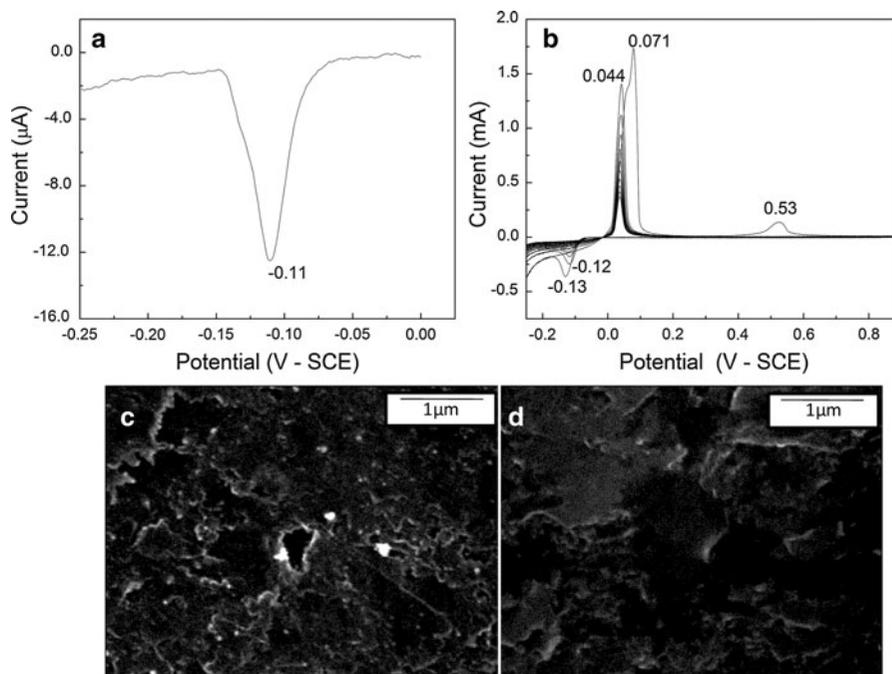
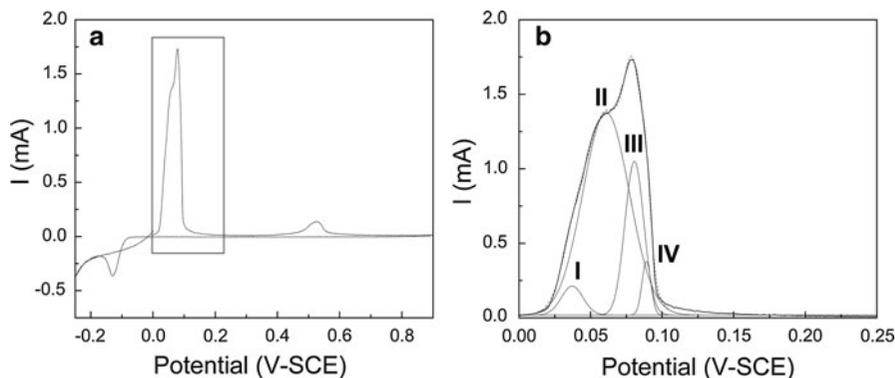
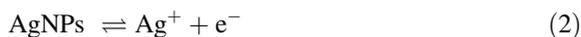


Fig. 6 First cycle starting at 0 V at 0.1 Vs⁻¹ (a) and the corresponding magnification of the positive-going scan between 0 and 0.25 V, including the deconvoluted voltammetric contributions assigned to the different chloride compounds: I at 0.036 V, II at 0.060 V, and III at 0.082 V (b)



species may diffuse toward the bulk solution, explaining the disappearance of the voltammetric signal in the following cycles (Fig. 5b), in agreement with early reports (Brolo and Sharma 2003).

The second stage, which takes place at 0.53 V, corresponds to the dissolution of the remaining AgNPs:



In this case, the width at half height is ca. 60 mV, as expected for an irreversible redox process of an adsorbed entity (Bard and Faulkner 2001).

Finally, in the following negative-going scan, a single cathodic contribution at -0.13 V is attributed to the reduction of electrochemically formed AgCl, thus completing the cycle.

In light of all the evidence presented here, we propose that AgNPs are susceptible to aggregation triggered by the presence of chloride anions, even when the capping agent is sufficient to prevent the aggregation caused by an increase in the ionic strength. The difference relies on the fact that chloride ions are capable of forming compounds with adsorbed Ag(I) cations on the nanoparticle surface. We regard the aggregation mechanism as a two-step process. First, AgNPs are partially oxidized to AgCl and AgCl_2^- . This can be seen in Fig. 2 as a starch jelly-like structure that wraps the remaining nanoparticles, which are logically reduced in their size. In the second process, the structure coagulates into aggregates. In our opinion, the structure of these aggregates may differ depending on whether AgCl or AgCl_2^- prevails, due to the different molecular geometry of both species. The linear structure of AgCl_2^- (Liu et al. 2012) would orient the aggregates to the formation of a chain-like structure (Li et al. 2010, 2012), while the

non-linear structure of AgCl would produce bulky aggregates, as in our case (Fig. 2b).

Conclusions

To sum up, NaCl induces the aggregation of AgNPs by a mechanism independent of the ionic strength that involves the formation of adsorbed crystalline AgCl and/or AgCl_n^{1-n} compounds. Silver nanoparticles are stabilized from the effect of chloride anions by the combined effect of starch protection and high pH. Our results highlight the genuine state of AgNPs in real media, where chloride anions are ubiquitous, yielding reasonable doubts on the utility of AgNP-based products.

Acknowledgments This work was supported by the PEDE CIBA (PNUD/URU/97/016) through a grant awarded to S.B, the CSIC (UdelaR) project awarded to S.B, and the ANII-FCE project awarded to EM. The Laboratorio de Biomateriales belongs to the Centro Interdisciplinario en Nanotecnología, Química y Física de Materiales, Espacios Interdisciplinarios, UdelaR. E.M. is a PEDECIBA and ANII researcher. We also want to give special thanks to Dr. Enrique A. Dalchiele for his contribution in the XRD measurements and Dr. Carlos Kremer for a helpful discussion on the draft manuscript.

References

- Arvizo RR, Bhattacharya S, Kudgus RA, Giri K, Bhattacharya R, Mukherjee P (2012) Intrinsic therapeutic applications of noble metal nanoparticles: past, present and future. *Chem Soc Rev* 41:2943–2970
- Bard AJ, Faulkner LR (2001) *Electrochemical methods. Fundamentals and applications*. Wiley, New York
- Beer C, Foldbjerg R, Hayashi Y, Sutherland D, Autrup H (2012) Toxicity of silver nanoparticles—nanoparticle or silver ion? *Toxicol Lett* 208:286–292

- Botasini S, Méndez E (2012) On the purity assessment of solid sodium borohydride. *J Power Sources* 197:218–223
- Botasini S, Dalchiele E, Benec J, Méndez E (2011) Stabilization of triangular and heart-shaped plane silver nanoparticles using 2-thiobarbituric acid. *J Nanopart Res* 13:2819–2828
- Brolo AG, Sharma SD (2003) Using probe beam deflection (pbd) to investigate the electrochemical oxidation of silver in perchlorate media in the presence and absence of chloride ions. *Electrochim Acta* 48:1375–1384
- Chaloupka K, Malam Y, Seifalian AM (2010) Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications. *Trends Biotechnol* 28:580–588
- Chinnapongse SL, MacCuspie RI, Hackley VA (2011) Persistence of singly dispersed silver nanoparticles in natural freshwaters, synthetic seawater, and simulated estuarine waters. *Sci Total Environ* 409:2443–2450
- El-Badawy AM, Luxton TP, Silva RG, Scheckel KG, Suidan MT, Tolaymat TM (2010) Impact of environmental conditions (pH, ionic strength, and electrolyte type) on the surface charge and aggregation of silver nanoparticles suspensions. *Environ Sci Technol* 44:1260–1266
- Gang W, Yu Z, Yiping C, Muyun D, Mi L (2005) Study on the non-linear refraction of silver nanoparticles with aggregation effect. *Opt Commun* 249:311–317
- Hebeish A, El-Shafei A, Sharaf S, Zaghoul S (2011) Novel precursors for green synthesis and application of silver nanoparticles in the realm of cotton finishing. *Carbohydr Polym* 84:605–613
- Huang Z, Jian X, Guo D, Gu N (2011) Controllable synthesis and biomedical applications of silver nanomaterials. *J Nanosci Nanotechnol* 11:9395–9408
- Jiang X, Yu A (2008) Silver nanoplates: a highly sensitive material toward inorganic anions. *Langmuir* 24:4307
- Lampre I, Pernot P, Mostafavi M (2000) Spectral properties and redox potentials of silver atoms complexed by chloride ions in aqueous solution. *J Phys Chem B* 104:6233–6239
- Levard C, Hotze EM, Lowry GV, Brown GE Jr (2012) Environmental transformations of silver nanoparticles: impact on stability and toxicity. *Environ Sci Technol* 46:6900–6914
- Li L, Zhu Y (2006) High chemical reactivity of silver nanoparticles toward hydrochloric acid. *J Colloid Interf Sci* 303:415–418
- Li X, Lenhart JJ, Walker HW (2010) Dissolution-accompanied aggregation kinetics of silver nanoparticles. *Langmuir* 26:16690–16698
- Li X, Lenhart JJ, Walker HW (2012) Aggregation kinetics and dissolution of coated silver nanoparticles. *Langmuir* 28:1095–1104
- Liu J, Hurt R (2010) Ion release kinetics and particle persistence in aqueous nano-silver colloids. *Environ Sci Technol* 44:2169–2175
- Liu J, Sonshine DA, Shervani S, Hurt RH (2010) Controlled release of biologically active silver from nanosilver surfaces. *ACS Nano* 4:6903–6913
- Liu X, Lu X, Wang R, Zhou H (2012) Silver speciation in chloride-containing hydrothermal solutions from first principles molecular dynamics simulations. *Chem Geol* 294–295:103–112
- Mirzajani F, Ghassempour A, Aliahmadi A, Esmaeili MA (2011) Antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus*. *Res Microbiol* 162:542–549
- Mulfinger L, Solomon S, Bahadory M, Jeryarajasingam A, Rutkowsky S (2007) Synthesis and study of silver nanoparticles. *J Chem Educ* 28:322–325
- Piccapietra F, Sigg L, Behra R (2012) Colloidal stability carbonate-coated silver nanoparticles in synthetic and natural freshwater. *Environ Sci Technol* 46:818–825
- Prathna T, Chandrasekaran N, Mukherjee A (2011) Studies on aggregation behaviour of silver nanoparticles in aqueous matrices: effect of surface functionalization and matrix composition. *Colloid Surf A* 390:216–224
- Quadros ME, Marr LC (2011) Silver nanoparticles and total aerosols emitted by nanotechnology-related consumer spray products. *Environ Sci Technol* 45:10713–10719
- Raveendran P, Fu J, Wallen SL (2003) Completely “green” synthesis and stabilization of metal nanoparticles. *J Am Chem Soc* 125:13940–13941
- Saini R, Srivastava A, Gupta P, Das K (2011) pH dependent reversible aggregation of chitosan and glycol-chitosan stabilized silver nanoparticles. *Chem Phys Lett* 511:326–330
- Sharma VK, Yngard RA, Lin Y (2009) Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities. *Adv Colloid Interf* 145:83–96
- Singh M, Sinha I, Mandal RK (2009) Role of pH in the green synthesis of silver nanoparticles. *Mater Lett* 63:425–427
- Singh P, Parent KL, Buttry DA (2012) Electrochemical solid-state phase transformations of silver nanoparticles. *J Am Chem Soc* 134:5610–5617
- Stebounova LV, Guio E, Grassian VH (2011) Silver nanoparticles in simulated biological media: a study of aggregation, sedimentation, and dissolution. *J Nanopart Res* 13:233–244
- Vigneshwaran N, Nachane RP, Balasubramanya RH, Varadarajan PV (2006) A novel one-pot ‘green’ synthesis of stable silver nanoparticles using soluble starch. *Carbohydr Res* 341:2012–2018
- Vimala K, Sivudu KS, Mohan YM, Sreedhar B, Raju KM (2009) Controlled silver nanoparticles synthesis in semi-hydrogel networks of poly(acrylamide) and carbohydrates: a rational methodology for antibacterial application. *Carbohydr Polym* 75:463–471
- Wang W, Lu W, Jiang L (2009) AgCl and Ag/AgCl hollow spheres based on self-assemblies of a multi-amine head surfactant. *J Colloid Interf Sci* 338:270–275
- Xiu Z, Ma J, Alvarez PJJ (2011) Differential effect of common ligands and molecular oxygen on antimicrobial activity of silver nanoparticles versus silver ions. *Environ Sci Technol* 45:9003–9008
- Zayat M, Einot D, Reisfeld R (1997) In-situ formation of AgCl nanocrystallites in films prepared by the sol–gel and silver nanoparticles in silica glass films. *J Sol–Gel Sci Technol* 10:67–74
- Zhang W, Yao Y, Li K, Huang Y, Chen Y (2011) Influence of dissolved oxygen on aggregation kinetics of citrate-coated silver nanoparticles. *Environ Pollut* 159:3757–3762



Contents lists available at ScienceDirect

Analytica Chimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aca



Review

Toward decentralized analysis of mercury (II) in real samples. A critical review on nanotechnology-based methodologies

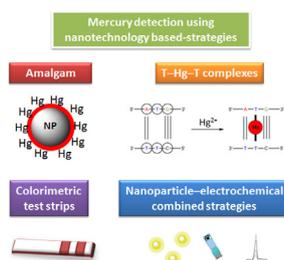
Santiago Botasini, Gonzalo Heijo, Eduardo Méndez*

Laboratorio de Biomateriales, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Iguá 4225 casi Mataojo, 11400 Montevideo, Uruguay

HIGHLIGHTS

- Several methods based on nanotechnology achieve limit of detections in the pM and nM ranges for mercury (II) analysis.
- Most of these methods are validated in filtered water samples and/or spiked samples.
- Thiols in real samples constitute an actual competence for any sensor based on the binding of mercury (II) ions.
- Future research should include the study of matrix interferences including thiols and dissolved organic matter.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 April 2013
Received in revised form 26 July 2013
Accepted 29 July 2013
Available online xxx

Keywords:

Amalgam
Mercury (II) ion
Nanoparticle
Electrode
Real sample

ABSTRACT

In recent years, it has increased the number of works focused on the development of novel nanoparticle-based sensors for mercury detection, mainly motivated by the need of low cost portable devices capable of giving fast and reliable analytical response, thus contributing to the analytical decentralization. Methodologies employing colorimetric, fluorometric, magnetic, and electrochemical output signals allowed reaching detection limits within the pM and nM ranges. Most of these developments proved their suitability in detecting and quantifying mercury (II) ions in synthetic solutions or spiked water samples. However, the state of art in these technologies is still behind the standard methods of mercury quantification, such as cold vapor atomic absorption spectrometry and inductively coupled plasma techniques, in terms of reliability and sensitivity. This is mainly because the response of nanoparticle-based sensors is highly affected by the sample matrix. The developed analytical nanosystems may fail in real samples because of the negative incidence of the ionic strength and the presence of exchangeable ligands. The aim of this review is to critically consider the recently published innovations in this area, and highlight the needs to include more realistic assays in future research in order to make these advances suitable for on-site analysis.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

Abbreviations: T–Hg^{II}–T, thymine–mercury (II)–thymine; DFT, density functional theory; AuNPs, gold nanoparticles; AgNPs, silver nanoparticles; SPR, surface plasmon resonance; LOD, limit of detection; AuNRs, gold nanorods; AuNDs, gold nanodisks; AgNTs, silver nanotriangles; AgNDs, silver nanodisks; DNA, deoxyribonucleic acid; dsDNA, double stranded deoxyribonucleic acid; ssDNA, single stranded deoxyribonucleic acid; SG, SYBR Green I; polyT–ssDNA, polythymine single stranded deoxyribonucleic acid; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; SAMMS, self-assembled monolayers on mesoporous silica; HF–LPME, hollow fiber-based liquid three-phase micro extraction; MPA, mercaptopropionic acid; HCys, homocystine; PDCA, 2,6-pyridinedicarboxylic acid; PAN, 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol.

* Corresponding author. Tel.: +598 2 525 0749; fax: +598 2 525 0749.

E-mail addresses: sbotasini@fcien.edu.uy (S. Botasini), gheijo@gmail.com (G. Heijo), emendez@fcien.edu.uy (E. Méndez).

0003-2670/\$ – see front matter © 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2013.07.067>

Please cite this article in press as: S. Botasini, et al., Toward decentralized analysis of mercury (II) in real samples. A critical review on nanotechnology-based methodologies, Anal. Chim. Acta (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2013.07.067>

Contents

1. Introduction	00
2. Solution chemistry of mercury (II) ions	00
3. Nanotechnology-based methodologies	00
3.1. Sensors based on mercury amalgam or complex formation onto silver and gold nanoparticles	00
3.2. Sensors based on T–T mismatch–Hg complexes	00
3.3. Sensors based on nanoparticle immobilization and colorimetric test strips	00
3.4. Nanoparticle–electrochemical combined strategies	00
4. Issues on real samples mercury analysis	00
4.1. Sample storage	00
4.2. Sample pre-treatments	00
4.3. Procedures for mercury pre-concentration	00
4.4. How useful are nanotechnology-based methodologies in decentralized analysis?	00
5. Conclusions and needs for future research	00
Acknowledgements	00
References	00



Santiago Botasini is an advanced Doctorate in Chemistry student at the Biomaterials laboratory at the Chemical Biology Institute of the Faculty of Sciences, University of the Republic (UdelaR), Uruguay. He graduated in Biochemistry at the UdelaR, Uruguay, in the topic of synthesis and characterization of non-spherical silver nanoparticles. He is now involved in the synthesis of silver nanoparticles resistant to aggregation in real media, and their applications in mercury analysis.



Eduardo Méndez is Head of the Biomaterials laboratory at the Chemical Biology Institute of the Faculty of Sciences, University of the Republic (UdelaR), Uruguay. He received his MSc in Chemistry in 1993, his Doctorate in Chemistry in 2001 at the UdelaR, Uruguay, and performed postdoctoral studies at Karlsruhe and Ulm Universities, Germany. He is now a full time Associate Professor of Physical Chemistry for biochemistry majors at the Faculty of Science, UdelaR. His major research interests concern the synthesis, characterization, and application of metal nanoparticles, the development of decentralized systems for environmental and clinical analysis, and the synthesis and characterization of biomaterials for bone replacements.



Gonzalo Heijo is researcher at the Biomaterials laboratory at the Chemical Biology Institute of the Faculty of Sciences, University of the Republic (UdelaR), Uruguay. He graduated in Chemistry and received his MSc in Chemistry in 1995 at UdelaR, Uruguay, on the topic of environmental remediation. He has large experience in the use of portable analytical devices for metal monitoring employing electrochemical systems.

1. Introduction

Mercury vapor is a stable monatomic gas with properties somewhat similar to the noble gases. Thus, its residence time in the atmosphere is of the order of a year or more, allowing for the global distribution of this element via the atmosphere [1]. However, despite the fact that the atmosphere is the main conduit for mercury transport, the actual concentrations are so low to make a significant contribution to overall human exposure. Nevertheless, mercury is removed from the atmosphere by an oxidation process, and the ionic form is distributed by rain water, being Hg^{2+} , $\text{Hg}(\text{OH})_2$, Hg° the common mercury aqueous species [2]. Seafood consumption is one of the main sources of human exposure due to its methyl–mercury content, which formation takes place mediated by a variety of microorganisms in the water, and biomagnifies in the aquatic food chain [3,4]. Methyl–mercury selectively damages the brain [5], and due to its high solubility in lipids readily cross the placenta and accumulate in fetal tissues [6–8], disrupting the normal development of the fetal brain [6,7,9]. Mercury ions coming from direct ingestion or inhaled from mercury vapors, bond to glutathione and/or cysteine forming the corresponding thiol-conjugated complex [10] which, due to its structural similarity to

methionine, is transported into cells via a widely distributed amino acid carrier protein [11,12]. Methyl–mercury has a relatively long biological half-life in humans (44–80 days) and its excretion occurs via feces, breast milk, and urine.

Analytical techniques suitable for total Hg determination at the picogram level are either based on cold vapor atomic absorption, plasma atomic emission and fluorescence spectrometries [13–15]. However, in recent years, the need of simplified on-site monitoring techniques opens the door to novel sensors based on nanotechnology developments, which are good candidates for decentralized analysis. The efforts made to develop mercury sensors were mainly directed to solve the transduction mechanisms (optical, electrochemical, fluorescent) and recognition probes (small organic molecules, DNA, metals), as reviewed in the last years [15–20]. However, most of the work done has only demonstrated the feasibility of such sensors in buffered solutions or artificial matrices [18], and whether these sensors are suitable for real samples remain eluded.

The aim of the present article is to critically discuss the applicability to the analysis of real samples of the nanotechnology-based sensors. For such purpose, after the general introduction to the topic of this review (Section 1) we will discuss in Section 2 the basics of mercury (II) solution chemistry; Section 3 is devoted to the review of nanotechnology-based strategies for mercury analysis, and Section 4 is focused on the analytical problems associated to real sample analysis, and the discussion of the feasibility of the previously mentioned methods to be used in the analysis of such samples. Finally, Section 5 ends with the conclusions and our opinion on the needs for future research to solve the actual problems.

In order to facilitate the comparison between the works reviewed, we use *molarity* (M) as concentration units throughout the text, employing the equivalences $1 \text{ ppb} = 1 \mu\text{g L}^{-1} = 5 \text{ nM}$.

2. Solution chemistry of mercury (II) ions

Compared to other metals of the *d*-block, mercury has several properties that are explained by its unique electronic configuration. All available sub shells from 1s to 6s are completely filled with electrons, in such a way that their removal is pretty resisted. The absence of oxidation states greater than 2 indicates that the *d* electrons do not participate in the bonding with the ligands, although recent theoretical and experimental results showed some contradicting examples [21]. The electronic configuration of mercury (II) ion, [Xe] 5d¹⁰ 6s⁰, suggests that the mechanism of binding involves hybridization of the *s*–*d**σ* orbitals of the mercury (II) ions, which share the electronic density of the ligand [22].

The solution chemistry of mercury (II) ion is dependent on the relative stability of the hydrated and the complexed ion. In the hydrated ion, mercury (II) is coordinated with six water molecules in a distorted octahedron configuration [23]; four water molecules are slightly more strongly bound than the other two in the axial positions [24], which explains the strong tendency of mercury (II) ions to form collinear complexes [25]. Nevertheless, its large ionic radius favors the formation of higher coordination number complexes with a particular donor through an associative process, making feasible the ligand exchange mechanism. The measured rates of ligand exchange for mercury (II) complexes of simple ligands are exceptionally high [26].

According to Pearson [27], mercury (II) ion is classified as a soft specie due to its large size and polarizability, and as a consequence, shows affinity to soft donor species, like S, Se and P, and for the halide ions I[−], Br[−] and Cl[−]. *O*-donor ligands are considered as hard, while *N*-donor ligands show intermediate characteristics between hard and soft ligands. Hence, the expected strength of the interactions between mercury (II) ions and the different ligands is *S*-donor > *N*-donor > *O*-donor.

As will be evidenced in this review, many of the sensors developed for mercury (II) ions are based on the formation of the Thymine–Mercury (II)–Thymine ensemble (T–Hg^{II}–T). The mercury (II) ion stabilizes the thymine–thymine mismatched base pair [22] with a conditional stability constant for the T–Hg^{II}–T bridge formation of ca. 10¹⁸ (M^{−1}) at 298 K [28], providing enhanced stabilization of the DNA structure in comparison to the non-mismatched ensemble [29]. The formation of the T–Hg^{II}–T ensemble consists in the dehydration of mercury (II) ions and substitution of each proton in –NH group at position 3 of the thymine molecules. Compared to other divalent ions, the ionic radius of mercury (II) ion is optimal for fitting into the double stranded DNA without steric disturbance of the helical structure [30]. Recent Density Functional Theory (DFT) calculations reveal the preference for *O*-atoms in the mono-coordinated complex, and *N*-atoms in the bi-coordinated one [31]. Raman spectroscopy supported by DFT calculations agree with existence of resonance structures that includes the N–Hg bonded and dissociated states, leading to a cationic character of the Hg nucleus in the T–Hg^{II}–T ensemble [32].

3. Nanotechnology-based methodologies

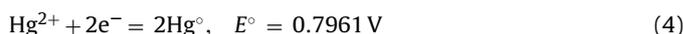
Spherical gold (AuNPs) and silver (AgNPs) nanoparticles are widely used as optical sensing materials due to the high molar extinction coefficients of their surface plasmon resonance (SPR) absorption band: 10⁸ M^{−1} cm^{−1} [33] and 10¹⁰ M^{−1} cm^{−1} [34], respectively. The wavelength position of the SPR band depends on the size and nanoparticle's immediate surroundings (i.e. adsorbed species, amalgam formation, or capping agents). Also, as a consequence of different exogenous factors, like surface complexation or changes in the medium ionic strength, nanoparticles can aggregate giving characteristic colorimetric responses (Table 1). All these

characteristics have been advantageously used in the design of different sensors with different limit of detection (LOD).

3.1. Sensors based on mercury amalgam or complex formation onto silver and gold nanoparticles

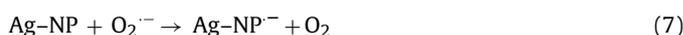
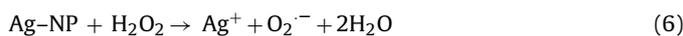
This is one of the simplest, but less explored strategies of all. Mercury amalgams are alloys formed by the reaction of zero valent mercury with other metals, especially gold and silver, for which they have high affinity [35]. When AgNPs are used instead of bulk silver metal for the reduction of mercury (II) ions, the reaction takes place in a Hg:Ag molar ratio of 1.125:1 on the surface of the AgNP, with no detectable oxidation, forming a Hg–Ag amalgam [36], a phenomena taking place below a critical nanoparticle size of 32 nm. This molar ratio is lower than 1:2, the one observed when using silver at the bulk scale.

Mercury amalgam sensing methods are mainly based on two characteristic properties of AgNPs: the specificity of the amalgam formation, and its high molar extinction coefficient. In addition, formation of a mercury amalgam on AgNPs is accompanied by a blue shift in the SPR band [37–39]. AgNPs spontaneously trigger amalgam formation from mercury (II) and/or mercury (I) solutions without the need of the addition of any reduction agent. This is a direct consequence of their close redox potentials (Reactions (1) and (4)) [40,41]. Moreover, mercury ions reduction is also favored on AgNPs compared to bulk Ag due to the decrease of the redox potential with the size [42]. Hence, unlike gold and based on pure thermodynamic considerations, AgNPs spontaneously react with mercury species regardless their redox state: Hg⁰, Hg(I) or Hg(II) [43].



The presence of increasing concentrations of mercury (II) ions causes a blue shift of the SPR band concomitantly with its reduction in intensity [41]. The physicochemical change is attributed to the strong bond between the mercury and the silver surface forming an amalgam-like structure that affects the SPR absorption band. Additionally, the colorimetric response of AgNPs is specific to mercury (II) ions among other common metals ions such as Pb²⁺, Cd²⁺, Zn²⁺, Ca²⁺, Cu²⁺, Mn²⁺, Ce³⁺, Al³⁺, K⁺, Na⁺, Co²⁺, Ag⁺, Ni²⁺ and Mg²⁺. On the other hand, the detection sensitivity depends on the method and/or the analyst subjectivity, provided the detection is performed by the “naked eye” [41,44–46].

Despite AgNPs reduce mercury (II) ions at high concentrations without any additional reduction agent, the addition of a mild agent like hydrogen peroxide helps to increase the sensitivity of the method [47]. The addition of small amounts of hydrogen peroxide triggers the quick reduction of the mercury (II) ions and therefore the colorimetric response can be seen at lowers levels of mercury. The proposed mechanism involves two coupled reactions:



where AgNPs catalyze the decomposition of H₂O₂ through a reformation process [48] generating superoxide anion and Ag⁺ ion (Reaction (6)). Then, the superoxide anion mediates the formation of electron-charged AgNPs (AgNP^{•−}) (Reaction (7)) which behave

Table 1
Color of the colloidal solutions formed by gold and silver nanostructures with different shapes and aggregation states.

Nanostructure	Shape	SPR wavelength range (nm)	Color of the colloidal solution
<i>Silver nanostructures</i>			
AgNP	Spherical	380–450	Yellow
AgNP aggregated	Spherical	600–700	Bluish gray
AgNT	Triangular	600–800	Bluish green
AgND	Disk	500–650	Light violet
<i>Gold nanostructures</i>			
AuNP	Spherical	500–550	Red
AuNP aggregated	Spherical	550–650	Blue
AuNR	Rod	600–650	Greenish blue
AuNR aggregated	Rod	900	Colorless
AuND	Disk	530	Red

like an electron pool. Both AgNP^{*+} and superoxide anion can reduce the Ag^+ to Ag^0 , leading to the regeneration of the nanoparticles.

Spherical AgNPs does not fulfil the requirements of a colorimetric sensor for ultra-trace analysis when using the amalgam method, as the shift in the SPR band is not high enough to be detected by the naked eye (Table 1). However, other nanoparticle structures improve the colorimetric response. Mercury amalgamation induces gold nanorods (AuNRs) re-shaping into gold nanodisks (AuNDs), a process that is accompanied by a dramatic change in the SPR band position [49], and can be immobilized onto glass slides [50].

The use of ligands with high affinity for mercury (II) ions attached to gold nanostructures proved to be a highly sensitive alternative. AuNRs can be end-to-end assembled by means of the specific T– Hg^{II} –T interaction between DNA strands, leading to a very sensitive sensor [51]. AuNRs derivatized with a N-alkylaminopyrazole ligand [52] form a complex with mercury (II) ions leading to AuNRs aggregation with the corresponding color change, with an enhanced sensitivity. AuNPs capped with 2,5-dimercapto-1,3,4-thiadiazole aggregate in the presence of micromole concentrations of mercury (II) ions, but despite no change in the UV–Vis spectra is noticeable, in the picomolar range, an enhanced fluorescent emission is obtained due to photoinduced electron transfer and metal binding-induced conformational restriction upon complexation [53]. On the contrary, the same ligand attached to AgNPs does not show this property and a decrease in the fluorescent intensity due to aggregate formation is observed [54]. A femtomolar LOD level is achieved by luminescence measurements with 3,5-diamino-1,2,4-triazole-capped AuNPs, which in the presence of mercury (II) ions forms large chain-like aggregates induced by complexation [55].

AgNPs can experiment shape transformations [56] and size reductions [57] triggered by the presence of ions capable of forming insoluble salts with silver, like chloride. As this anion is ubiquitous in real media, it can severely interfere with sensors involving amalgam formation. Alkanethiols as capping agents not only are adequate for preventing insoluble silver salt formation [46,58], but also strongly interact with mercury (II) ions. In this way, the presence of mercury (II) ions in a colloidal solution of AgNPs induce the preferential detachment of adsorbed alkanethiols from the more active sites of some nanoparticles, like the borders and tips of silver nanotriangles (AgNTs). The strong dependence of the SPR band on the shape of silver nanostructures (Table 1) constitutes the basis of a different mercury sensor, that take advantage of the formation of Hg^{II} -alkanethiol complex, leaving naked tips of AgNTs that are preferentially dissolved in the presence of iodide anions, thus inducing a shape change from nanotriangles to nanodisks (AgNDs). This sensor has a remarkable selectivity toward mercury (II) ions with a LOD of 3.3 nM in controlled laboratory environment, and reasonable recovery yield in spiked real samples like tap, drinking, and lake waters.

3.2. Sensors based on T–T mismatch–Hg complexes

Since the first report on the specific binding of mercury (II) ions to two thymine bases [59], there has been an increased interest in the development of sensors based on this concept, either using colorimetric, fluorometric or electrochemical detection modes. When AuNPs are brought close to one another, the SPR band shifts [60,61], and the colloidal solution changes from red to blue [62]. This concept is advantageously used for mercury sensing, based on the interaction between mercury (II) ions and two thymine bases. As thiolated DNA stabilizes AuNPs against aggregation [62], the strategy is to induce the aggregation of DNA-capped nanoparticles in the presence of mercury (II) ions, producing a color change due to the shift in the localization of the SPR band. The original design of Mirkin's sensor [33] consists on the separate fabrication of two AuNPs solutions, each one protected with two different 5'-thiolated DNA which are complementary to each other, except for several thymine mismatches that prevents the DNA hybridization. Once both solutions are mixed, in the absence of mercury (II) ions the colloidal solution remains stable and no color change is observed (Fig. 1a). On the contrary, if mercury (II) ions are present, several T– Hg^{II} –T bridges are formed, the AuNPs aggregate, and the color of the colloidal solution changes from red to blue. The formation of T– Hg^{II} –T bridge, and the general concept developed by Mirkin's group is one of the most prolific approaches for mercury sensor design.

The change in the Gibbs energy for the T– Hg^{II} –T bridge disassembly is ca. 100 kJ mol⁻¹ [28]; this stabilization is reflected in a shift of the transition profile of DNA containing T:T mismatch of ca. 10 degrees [29]. In order to amplify the signal and improve the sensitivity, instead of only considering the color change, Mirkin and his co-workers [33] measured the changes in the average transition temperature (T_m) of the DNA–AuNPs ensemble (Fig. 1b). The sharp and highly cooperative melting properties of the DNA–AuNPs conjugates enable to distinguish subtle differences in T_m , thus extending the limit of detection. The linear dependence between T_m and mercury concentration is the basis of the quantitative analysis: each 1 μM increase in mercury (II) concentration produces an increase in T_m by ca. 5 °C. The LOD achieved by this method is approximately 100 nM and the selectivity toward mercury (II) ion is remarkable [33].

Other authors exploit the fact that double stranded DNA (dsDNA) cannot efficiently protect nanoparticles from aggregation (Fig. 1c). The design of this type of sensors involves the use of two complementary single stranded DNA (ssDNA) with several thymine mismatches. In the absence of mercury (II) ions, the strands remain separated, and protect the nanoparticles even with the addition of a controlled amount of salt. On the contrary, if mercury (II) ions are present, both DNA strands join and therefore the nanoparticles aggregate with the same amount of salt concentration by

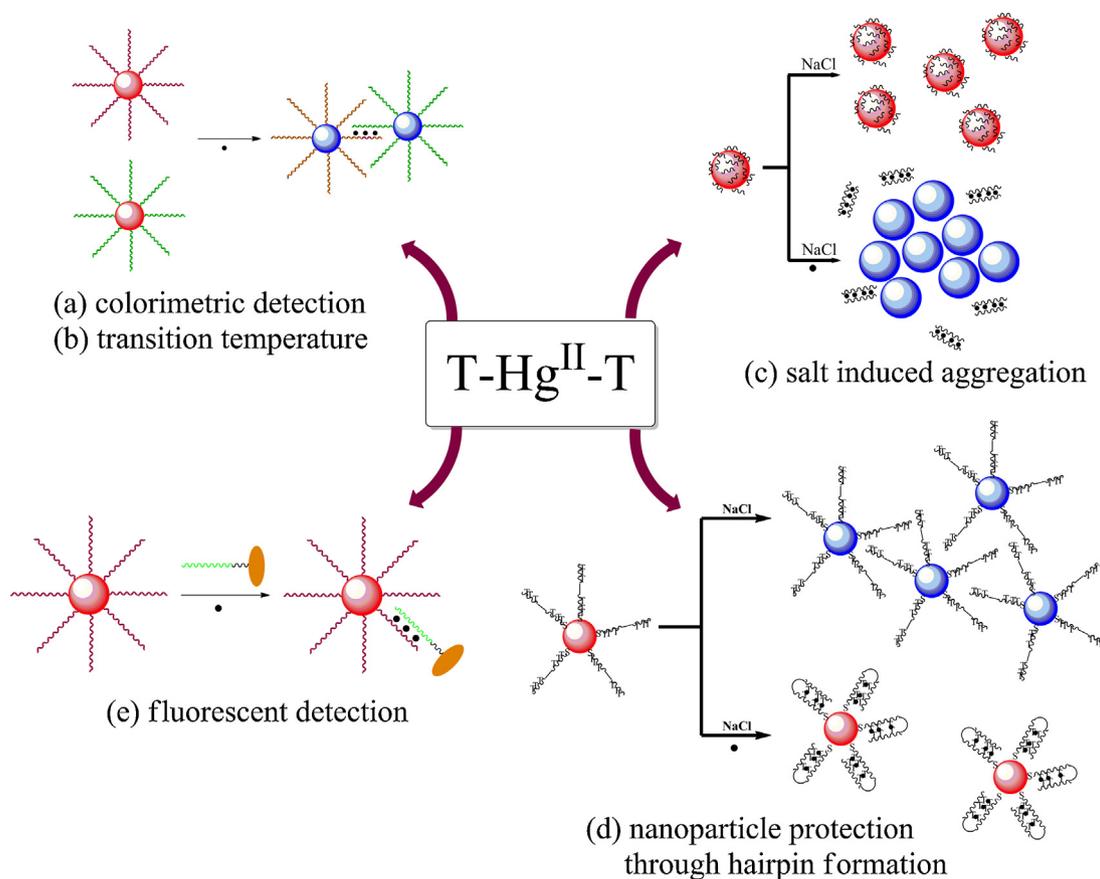


Fig. 1. Nanotechnology-based sensors involving the use of the T-Hg^{II}-T ensemble. (a, b) Hybridization of two rich-thymine DNA-capped AuNPs in the presence of mercury (II) ions, that can be followed using colorimetry or temperature transition measurements. (c) Differential protection exerted by ssDNA and dsDNA. (d) Hairpin formation allows for an effective protection of dsDNA provided the original ssDNA is attached to the surface via thiol ligation. (e) Interaction between a thiol modified rich thymine DNA attached to a AuNP and a rich thymine DNA with a fluorescent probe in one of its ends. Upon hybridization, the fluorescent signal is quenched.

electrostatic attraction [62]. By using the same concept, but employing magnetic nanoparticles, the aggregation process can be followed using the more sensitive magnetic relaxation measurements [63]. The length of the DNA strands and the number of thymine bases are key factors in the performance of the sensors. Long DNA strands with a large number of thymine mismatches results in a wider linear concentration range but less sensitivity [62,64], because it needs more mercury (II) ions in order to hybridize with its complementary DNA strand. On the contrary, a lower number of thymine mismatches needs less mercury (II) ions to hybridize, increasing the sensor sensitivity but narrowing the linear concentration range since a small amount of mercury ions can completely hybridize all DNA strands.

The instability of dsDNA can be overcome if the AuNPs are functionalized with a thiolated-ssDNA strand with several thymines that in the presence of mercury (II) ions folds into a hairpin structure [65]. The folded structure has a stabilizing effect toward nanoparticle salt-induced aggregation, and the sensing mechanism in this case is based on the aggregation of AuNPs in the absence of mercury (II) ions (Fig. 1d). In this case, the protection mechanism relies only on the electrostatic repulsion of the nanoparticles mediated by the negative charges of the phosphate backbone chain. The assay has a LOD of 60 nM in the concentration range between 0.1–10 μ M, and displays a high selectivity toward mercury ion compared to other ions as Ca²⁺, Zn²⁺, Mn²⁺, Ni²⁺, Co²⁺, Cd²⁺, Pb²⁺ and K⁺.

A better sensitivity is usually provided by fluorescence measurements as the output signal. Wang et al. [66] used AuNPs and

a pair of thymine rich ssDNA, one of them labeled with a fluorescent probe at the end (Fig. 1e). Upon formation of dsDNA mediated by the T-Hg^{II}-T complexes, due to its inefficient attachment to the nanoparticle, no fluorescent quenching is observed; but in the absence of mercury (II) ions, the AuNPs interact with the ssDNA, causing the quenching of the fluorescence activity. The LOD of this method is 40 nM, and using carbon nanoparticles instead of AuNPs the LOD is reduced to 10 nM [67].

Other sensors use physical separation methods to improve the LOD (Fig. 2). For example, a 5'-thiolated-polyT-ssDNA conjugated to AgNPs (Fig. 2a) are used as extraction agent [68]. Mercury (II) ions trapped within the thymine mismatches are separated by centrifugation, and hydrogen peroxide is added to release the DNA-nanoparticle complexes through oxidation of the AgNPs. The fluorescent dye SYBR Green I (SG), which weakly binds to the polyT-ssDNA, is then added to form a SG-T-Hg^{II} complex. The quantification is completed with flow injection analysis and fluorescent detection, achieving a LOD of 3 pM. The technique was tested in tap water and uses the standard addition method to eliminate any possible matrix effect. Cloud point extraction also was used as a physical enrichment method, taking advantage of the enhanced hydrophobicity produced by complexation between mercaptopropionic acid and homocystine modified AuNPs and mercury (II) ions (Fig. 2b). The enhanced hydrophobicity of the aggregate can be extracted in Triton TX-114, and the color change in the TX-114 rich phase from colorless to red provides the colorimetric detection with a LOD of 10 nM [69].

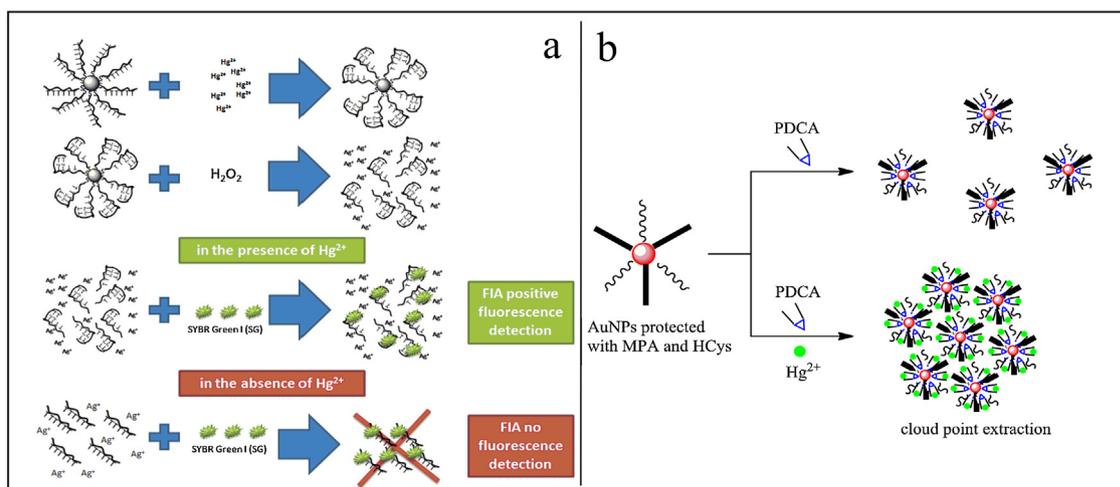


Fig. 2. Sensors that use physical separation methods (a) Trapped mercury (II) ions within a pair of polyT-DNA strands attached to AuNPs are centrifuged as a pre-concentration for further analysis. (b) Cloud point extraction of the hydrophobic ensemble formed upon complexation of mercaptopropionic (MPA) acid and homocysteine (HCys) modified AuNPs and mercury (II) ions in the presence of 2,6-pyridinedicarboxylic acid (PDCA).

Adapted from Refs. [68,69].

3.3. Sensors based on nanoparticle immobilization and colorimetric test strips

Immobilization procedures present various advantages over those performed in solution, avoiding non desired nanoparticle aggregation, sample pre-treatment, fast response, and it does not require the use of sophisticated instruments [70].

Duan and Guo [70,71] designed a strip sensor consisting in (i) a line of AuNPs conjugated with both 3'-biotinylated and 5'-thiolated thymine rich DNA₁ (AuNPs–DNA₁), (ii) a line with a DNA₂ strand partially complementary to DNA₁; and (iii) a layer with streptavidin that can capture the biotin–AuNPs–DNA₁ complex via the highly specific biotin–streptavidin interaction. In the absence of mercury (II) ions, AuNPs–DNA₁ is captured by both the DNA₂ and the streptavidin, forming two visible lines in the strip. If mercury (II) ions are present, AuNPs–DNA₁ recognizes them through the formation of T–Hg^{II}–T complex, and the DNA folds into a hairpin structure preventing its hybridization with the DNA₂. Provided the concentration of mercury (II) ions is high enough, only the control line is observed. The LOD in homogeneous systems lies between 3 and 5 nM, and no interference was observed with other metal ions like Co²⁺, Cd²⁺, Pb²⁺ and Cu²⁺.

He et al. [72] proposed another method following the same immobilization strategy, reaching a lower detection limit (0.1 nM), using antibodies and a portable strip reader that can measure the intensity of the bands. In this case, the sensor designed is composed of four pads: (i) the sample pad, (ii) the conjugated pad, (iii) the test zone and (iv) the control zone. The first one contains a rich thymine DNA₁ strand linked to a digoxin molecule in one of its ends (DNA₁–digoxin). The second zone a 5'-thiolated hairpin DNA₂ partially complementary to the DNA₁–digoxin strand conjugated to AuNPs (AuNPs–DNA₂). The third line contains anti-digoxin antibody, and finally the fourth line has a streptavidin conjugated to a biotinylated DNA (streptavidin–biotin–DNA₃), whose sequence is complementary to the DNA₂ strand. The principle of mercury (II) ion detection is based on T–Hg^{II}–T coordination chemistry and immune-capturing AuNPs. In the presence of mercury (II) ions, the DNA₁–digoxin interacts with the AuNPs–DNA₂ to generate a AuNPs–DNA₁–DNA₂–digoxin complex. Then the mixture migrates along the strip until the complex is captured on the test zone by the anti-dioxin antibodies. The accumulation of AuNPs produces a characteristic red band, enabling visual detection of the recognition

reaction. For their part, the excess AuNPs–DNA₂ migrates to the control zone where it is captured by the streptavidin–biotin–DNA₃ forming the control line. At a low sample concentration of mercury (II) ions, the test band intensity is reduced or even absent.

An alternative based on the fabrication of chips was proposed, where nanoparticles and amino modified DNA (5'-NH₂–C₁₀–T₆TT₆–3') are immobilized onto a Code Link Activated Slides, coated with *N*-hydroxysuccinimide ester reactive groups. First, a thiol modified DNA (5'-HS–A₁₀–T₆TT₆–3') is conjugated to AuNPs. Next, the slide and the DNA–AuNPs are incubated together for 24 h. Due to the thymine mismatch both DNA strands hybridize only in the presence of mercury (II) ions. The slide is washed to remove all non-hybridized DNA and the signal is revealed by the addition of silver nitrate and hydroquinone [73,74]. AuNPs function as a growing seed for the silver reduction, in other words if the nanoparticles are present (and consequently mercury (II) ions are present) growing onto the AuNPs, and therefore a clear spot is visualized. The limit of detection by this method is estimated in 10 nM, with the additional advantage of being portable.

3.4. Nanoparticle–electrochemical combined strategies

The USA Environmental Protection Agency provides electrochemical methods for the analysis of mercury in drinking water, natural surface water, seawater, domestic and industrial wastewater, and aqueous soil extracts [11]. However, these methods require a few steps that cannot be easily automated including extensive pre-treatments (polishing, surface contaminant oxidation, etc.) of the electrode surface. This affects their application as decentralized systems.

One of the most extended developments in electrochemical-based sensors is the incorporation of the screen–printed technology for the fabrication of disposable electrodes [75–77]. In recent developments regarding this technology, the incorporation of nanoparticles onto the electrode surface [78,79], or the use of nanohybrid materials combining different kind of nanomaterials [80] greatly enhances the analytical signals. Compared to bulk electrodes, the presence of nanoparticles on the electrode surface enables fast electron-transfer kinetics, reduces overpotential, and causes redox reactions to become kinetically feasible [81].

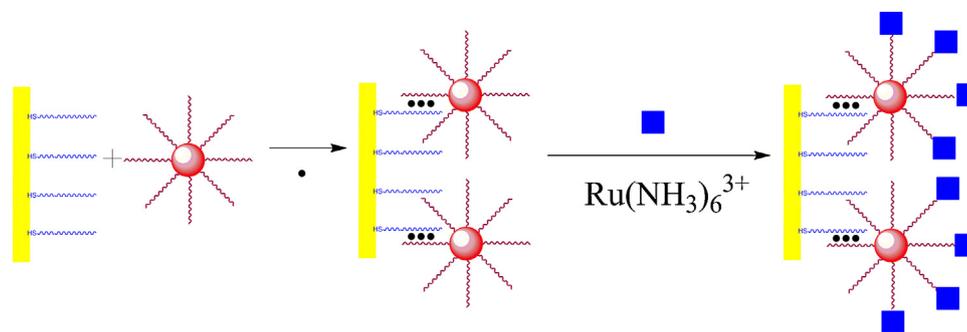


Fig. 3. Electrochemical detection strategy for mercury (II) sensing. A thiol-modified rich thymine DNA forms a monolayer onto a gold surface, and a solution containing another thiol-modified rich thymine DNA but attached to a AuNPs. In the presence of mercury (II) ions, hybridization takes place, and exposed phosphate anionic charges exposed are compensated by the addition of the redox active $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$.

Adapted from Ref. [82].

Nanoparticles also provide a larger surface area for analyte detection, leading to electrochemical sensors with lower detection limits.

A method joining T–Hg^{II}–T complex conjugated with AuNPs showed an increased sensitive employing electrochemical detection instead of the change in the optical properties [82]. In this design, a 5'-thiolated DNA strand with six strategically placed thymines is fixed onto the working gold electrode, and complementary thiolated DNA strand is attached to the AuNPs. In the presence of mercury (II) ions, the T–Hg^{II}–T ensemble mediates DNA hybridization and the AuNPs become attached to the electrode surface. Then, hexaammineruthenium (III) ions, which are electrostatically attracted to the anionic phosphate of DNA, are added to the system. The large number of AuNPs attached to the surface allows for a high load of hexaammineruthenium (III) ions, leading to a LOD of 10 nM (Fig. 3).

Carbon nanostructures have also been employed in the development of different electrochemical-based sensors. Stripping voltammetric detection is greatly enhanced, in terms of conductivity, selectivity and sensitivity, when AuNPs are homogeneously dispersed onto graphene electrodes, achieving a LOD as low as 30 pM [83]. The modification of glassy carbon electrodes with carbon nanotubes (CNT) allow for the voltammetric detection of mercury (II) in mouse blood, avoiding electrode fouling, compared to activated carbon (AC) and fullerene (C₆₀) [84]. The LOD achieved with this modification differs according to the sample matrix: 0.01 mM for seawater and 3 mM in blood. This reduction of the LOD by a factor of 100, as well as the comparatively low LODs, gives a clear idea of the important effect of the sample matrix.

4. Issues on real samples mercury analysis

The interest in mercury analysis relies mainly in the assessment of environmental and human contamination level, food analysis, and labor human exposure environments. However, most of the newly developed technologies were assessed on synthetic solutions or spiked samples, being unable to assess mercury in their real state. In this regard, one of the main flops is that nanotechnology-based sensors for mercury are still unable to discriminate between different mercury species, including the toxicologically relevant methyl-mercury [85]. The only approach that partially faced this challenge proved that the different mercury species, namely Hg^{II}, Hg^I and Hg⁰, amalgamate on AgNPs [43], confirming earlier deductions from thermodynamic redox potentials (see Section 3.1). Nevertheless, unless mercury species are previously separated, they cannot be detected and quantified simultaneously in the same sample.

As mentioned before, almost all strategies in mercury sensing development were tested in tap water, lakes or rivers, as the “real samples”. However, mercury (II) spikes were used to assess

mercury level, in such a way that bound mercury in the sample matrix could not be correctly evaluated. Moreover, more complex matrixes, such as blood, contaminated rivers, fish, or high ionic strength media, were rarely analyzed. Hence it is necessary to apply some pre-treatment to avoid any matrix interference and maintain the mercury under the preferable mercury (II) ion form.

Human blood and hair are often analyzed in order to estimate human exposure to mercury and its compounds. Blood is a suspension of cellular components containing about 3700 different proteins [86] that can interfere with the analysis. In addition, blood samples are usually obtained with added anticoagulants, which are either polyanions (e.g. heparin) or organic chelators (e.g. EDTA, citrate) with high affinity for metal species. Hair offers several advantages over analysis of blood: easier sample collection, storage, a natural pre-concentration of methyl-mercury, which is ca. 250 times higher than in blood. In both cases, the organic content of the samples must be destroyed in order to free mercury from its bound state [13].

Fish is another type of sample for which mercury analysis is needed, mainly after de Minamata disaster in Japan in 1979. As marine bacteria are responsible for mercury methylation in the oceans, fish are the initial propagators of this contaminant through the food chain web. Moreover, mercury is considered a natural contaminant for ocean fish, as evidenced by the fact that fish captured in the pre-industrial era [87] contained high level of this contaminant. For the general assessment of mercury levels in fish, total mercury content is accepted, while mercury speciation is not required. To achieve this goal, fish samples must be digested with an oxidizing acid mixture (concentrated HNO₃ + H₂SO₄) in order to free mercury from its organic complexes, and to oxidize all mercury to mercury (II) ions.

The different matrixes that are to be analyzed, puts into capital letters the importance of sample storage, pre-treatments, and pre-concentration procedures.

4.1. Sample storage

It is well documented the difficulty of preventing losses of low level mercury from aqueous solutions, mainly due to volatilization and adsorption on container walls. Container materials such as quartz, Pyrex glass, Teflon[®] and plastics made in polytetrafluoroethylene, or polyethylene terephthalate [85] are adequate to prevent such losses. Nevertheless, any working standard solution with a concentration below 0.05 nM should be carefully prepared freshly on a daily basis. In general, storage conditions for mercury containing samples are only stable for up to 5 weeks, unlike other heavy metals which can be stored for about 6 months [88], reinforcing the need of on-site methodologies.

4.2. Sample pre-treatments

Normally, strong acids and oxidants, such as HNO_3 , H_2SO_4 , $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$, KMnO_4 , $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, HCl and H_2O_2 and BrCl , are used for sample digestion procedures. All these substances must be analyzed and certified for mercury analysis. In other cases, as for hair samples, pre-treatments additionally involves the use of common solvents such as hexane, alcohol, acetone, water, diethyl ether, and detergents to remove dust and grease [13].

In solid sediments, mercury can be either extracted or analyzed in situ. EPA method 7473 provides the guidance to directly analyze the total amount of mercury without a previous extraction procedure. On the other hand, the speciation analysis requires the use of more exhaustive extraction procedures involving microwave irradiation or ultrasound, followed by mercury species isolation with the aid of organic solvents, column separations, and solid-phase extractions.

If only total mercury data is required, a simple sample digestion is enough. The methods can be either wet (oxidizing digestion) or dry (combustion/pyrolysis). Wet oxidation digestion requires the use of one or more acid agents, or the combined use of strong oxidizing agents together with a strong mineral acid. For solid samples it is also recommended to use hydrofluoric acid to completely remove mercury from the inorganic matrix. Wet digestion methods should be carried out with careful control of the temperature digestion (a water bath at 60–70 °C is recommended) to prevent mercury losses due to volatilization, or using sealed containers if higher temperatures (90–100 °C) are needed [13,85]. Combustion or pyrolysis procedures can be performed under reducing or oxidant conditions, and are normally combined with pre-concentration with sorbent materials that selectively traps mercury. The advantage of this approach is the avoidance of chemical interferences [13].

An innovative digestion pre-treatment using microwave heating system at 630 W was optimized for fish samples. A tissue sample of 0.1–0.4 g is incubated for 10 min with 2 mL of HNO_3 (70% v/v) and 1 mL of H_2O at 50 psi. Then the pressure is increased to 60 psi for the next 10 min and two series of 6 min at 80 and 100 psi, respectively.

Then, 2 mL of H_2O_2 (30% v/v) is added and the sample is finally incubated for another 10 min at 80 psi [89]. This digestion method proved to be effective, avoiding the use of strong mineral acids.

4.3. Procedures for mercury pre-concentration

The thiol Self Assembled Monolayers on Mesoporous Silica (thiol-SAMMS) are novel substrates with a porous siliceous structure functionalized with alkylthiols that bind mercury (II) ions with strong affinity and specificity, fast absorption rates, and useful in a wide pH range (4–12). They are formed by attaching a monolayer of molecules to mesoporous ceramic supports. The high surface area of the materials allows an extremely high density of binding sites [90,91], which make it specially suitable for mercury removal [90,92] in effluents or combined with electrodes for mercury pre-concentration and detection [93,94]. Thiol-SAMMS are able to rapidly absorb high mercury amounts with an estimated adsorption of ca. 98.9% of the total mercury initially present in the solution.

As an alternative, there has been great interest in exploiting the properties of organic materials as ionophors for mercury (II) ions detection. These ionophors are copolymers with a prevalence of thiol and sulfonic groups that exhibit a macroporous structure. Due to the strong affinity of thiol groups for mercury (II) ions, the ionophor acts as an ion exchange resin allowing for mercury concentration. For example, the ionophor mercaptostyrene-divinylbenzene deposited on a platinum working electrode gives selectivity and enhanced sensibility due to mercury concentration in the vicinity of the electrode, which can be followed by impedimetric detection [95].

Another example of combined technology involves hollow fiber-based liquid three-phase micro extraction (HF-LPME) technology with nanoparticles and electrochemical methods [96]. This technique can provide pre-concentration and cleanup of analytes simultaneously. In this method, the analyte of interest is extracted from the aqueous sample (donor solution) through a thin layer of an organic solvent, which is immobilized within a porous hollow

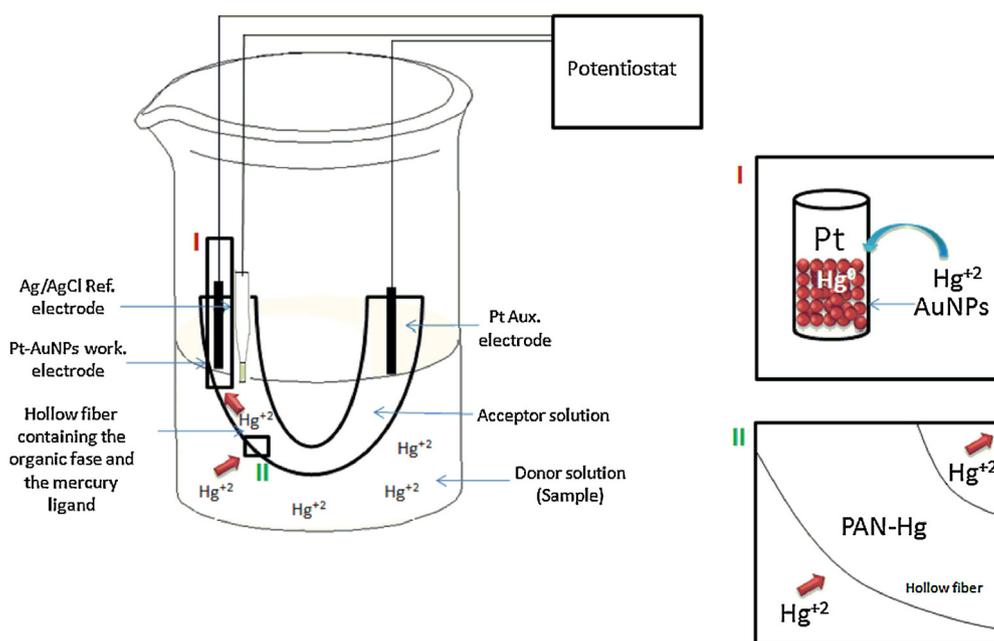


Fig. 4. Combined technology involving hollow fiber-based liquid micro phase extraction (HF-LPME) with AuNPs and electrochemical output signal. Mercury (II) ions in the donor solution are trapped by 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol (PAN) ligand and dissolved in the organic solvent immobilized onto the walls of a porous polypropylene hollow fiber. Inside the fiber is the acceptor solution containing EDTA, potassium nitrate and sulfuric acid. The sensor is completed using a platinum working electrode doped with AuNPs onto which mercury is amalgamated allowing its detection by differential pulse anodic stripping voltammetry. Both organic ligand trap and gold amalgamation provide a means by which mercury is concentrated, enhancing the sensor sensitivity. Adapted from Ref. [96].

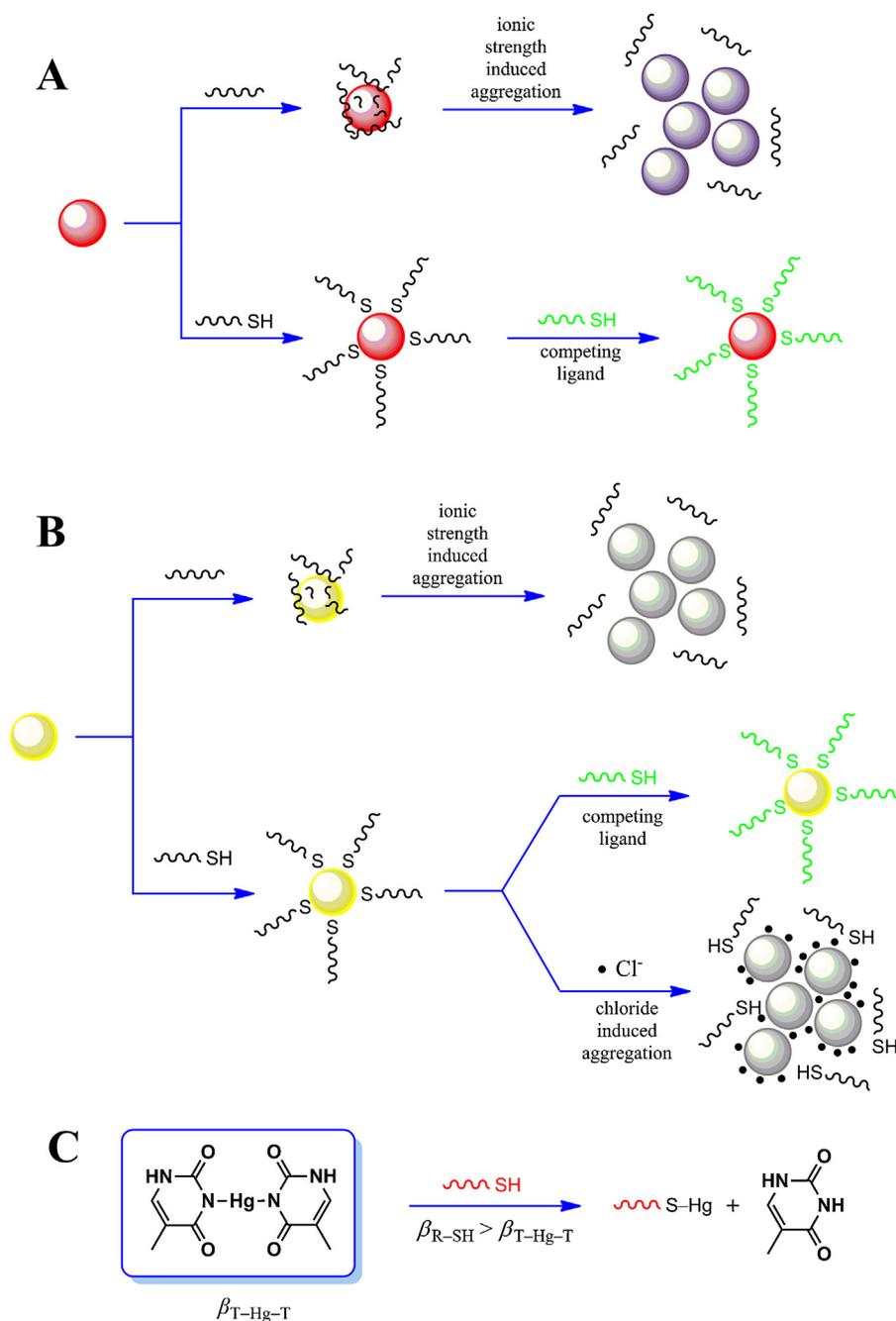


Fig. 5. Possible interactions of sensing devices in real media. (a) Capped AuNPs aggregate in the presence of relatively low levels of salt concentration, while thiol-capped AuNPs are stable under high ionic strength, but may experiment ligand exchange with other thiol molecules present in the sample. (b) AgNPs can also aggregate at relatively low ionic strength, and thiolated ligands can be exchanged with other thiols in solution, but halide forming insoluble salts with silver are able to induce AgNPs aggregation, independently of the nature of the capping agent. (c) T-Hg^{II}-T ensemble can be separated in the presence of thiols with higher affinity toward mercury (II) ions than the two thymine bases.

fiber, and then back-extracted into an acceptor solution inside the lumen of the hollow fiber (Fig. 4).

The fibers, being typically disposable, contribute to the elimination of sample carryover. The pores in the walls of the hollow fibers provide selectivity by preventing the extraction of macromolecules such as proteins and particles from the sample matrix. Mercury extraction is accomplished by the amalgamation process mediated through the presence of AuNPs, which are attached to the polymeric fiber that is linked to a platinum wire. Finally mercury concentration is quantified by differential pulse anodic stripping voltammetry. The presented method reaches a LOD of 0.06 nM, 0.15 nM and 0.19 nM in water, rice and fish samples, respectively,

with good accuracy compared to the standard inductively coupled plasma (ICP) measurements.

4.4. How useful are nanotechnology-based methodologies in decentralized analysis?

As already mentioned, there are several issues that jeopardize the use of the developed nanotechnology-based methodologies in real samples, discouraging their use in decentralized analysis. The capping agents employed in the synthesis of nanoparticles play a double role in the case of mercury analysis: stabilization of the colloidal solution, and to provide recognition elements for

the specificity of the analysis. Sometimes, both goals enter in contradiction when the analytical nanosystem faces the real samples, and as promising as these methods might be, there are several issues to overcome before it can be translated to practical applications.

Not all nanoparticles are stable at high ionic strength and extreme pH values [97]. For example, citrate-capped AuNPs undergo aggregation at a chloride concentration as low as 30 mM. In the case of AgNPs, aggregation takes place between 30–100 mM employing common capping agents [97], and there is another mechanism of aggregation caused by the reaction between AgNPs and halides that can form insoluble salts (Fig. 5a), such as sodium chloride, which is ubiquitous in real environments [57]. Those sensors based on nanoparticles aggregation are susceptible of aggregation under normal ionic strength conditions including relevant biological fluids [98] (Fig. 5a). As a consequence, the stability of the analytical nanosystems is incompatible with the concentrations employed in the acidic digestion step.

Although this problem might be easily overcome by employing thiol bound capping agents, the possibility of ligand exchange is a real problem (Fig. 5a,b), hardly ever considered in the analysis of the stability of the proposed sensors. Thiol molecules have high affinity toward mercury [99], but also gold and silver nanoparticles. The formation of mercury–thiol bonds is thermodynamically favorable ($\log\beta_{110}$ between 25 and 42), and kinetically labile [26], which favor substitution reactions in the presence of other ligands. In this competence, AgNPs or AuNPs might also take part, yielding new complications to a yet complicated system.

Cysteine and its derivatives, penicillamine and glutathione, are involved in many biological processes, being the latter the most abundant non-protein thiol in biological systems [99]. Moreover, glutathione, the metallothioneins, and 3-mercaptopropionic acid are present in large concentrations in aquatic or marine environments [100,101]. The interaction between mercury (II) ions and dissolved organic matter (DOM) provides an interesting example of this fact. Inconsistent measured $\log\beta_{110}$ values varying from 21.9 to 23.6 [102] or 29.9 to 33.5 [69] are obtained depending on the methodology employed. Nevertheless, these values indicate that DOM is able to sequester mercury (II) ions, because reported $\log\beta_{110}$ values are of the same order of thiol–mercury (II) complexes. Hence, incorrect elimination or neutralization of these compounds in the matrix may lead to the destruction of the analytical nanosystems. In addition, chloride anions are able to displace thiol-capped AgNPs, inducing halide formation induced aggregation. A novel approach to consider is the use of biogenic nanoparticles, which result from the reduction and capping of nanoparticles with biological molecules or mixture of molecules. For example, a recent report on the synthesis of AgNPs with yogurt demonstrates the stability of the obtained colloidal solutions up to 1 M salt concentration [103].

The stability of the T–Hg^{II}–T ensemble has to be considered, due to the importance of this interaction in the development of several sensors. The structure of this ensemble can be disrupted by the competence of thiols for mercury (II) (Fig. 5c). For example, cysteine, glutathione [58], and homocysteine [28] displace mercury (II) ions from their attachment to the T–T mismatch in a oligonucleotide molecular beacon.

The development of disposable strips constitutes a good alternative for decentralized analysis. In all cases these approaches solve many of the common problems associated to undesired nanoparticle aggregation reaching the necessary detection limit. For example, the immobilized nanosystem designed by Du et al. [104] is resistant to the ionic strength obtained after acid digestion and neutralization, and real samples as milk, juice and lake water could be analyzed. On the other hand, the techniques are only qualitative or semi-quantitative, being only useful for positive/negative tests.

5. Conclusions and needs for future research

There are a huge number of studies on the development of novel nanosystem-based strategies for mercury detection and quantification. However, only a few attempts have been made to apply them to real samples such as waste contaminants, blood, urine, fish tissue, etc. There is no unique and optimum technique to quantify mercury in all samples, and the detection limit and reliability of each method appeared to be variable depending on the sample matrix, and much rigorous studies are needed. Nevertheless, the best results were found in the combination of technologies, as in the use of nanoparticles and electrochemical methods (see Section 5). The use of modified electrodes with nanoparticles greatly improves the selectivity and sensitivity of the electrochemical measurements, and among all the reviewed techniques they seem to be the most promissory approach. The next step in the upcoming technology should be focused on the improvement of the presented strategies, in the aim to create functional automated sensors for decentralized and on site analyses.

As recently reviewed by Leopold et al. [85], common analytical techniques developed for mercury quantification are available with detection limits in the order of pM. For these methodologies, contamination, analyte losses, and interspecies conversion during sampling, storage and pre-treatment are key issues for sensitive and accurate determination. In this regard new challenges appear for the development of analytical techniques for on-site use, where the balance between sensitivity and accuracy on one side, and ease of use and simplicity on the other side, must be carefully considered. Despite the rapid and exciting developments of nanosystem-based methodologies, there is still a gap between laboratory research results and their applicability to real samples. Some available clean-up methods are suitable in decentralized systems, but they should use reagents that do not interfere with the sensor ensemble.

Thiol compounds present in real samples are one of the main interference in mercury analysis, due to its high affinity toward mercury (II) ions, as well as the possibility of ligand exchange between nanoparticle capping agents. Future assays for mercury (II) sensors should include their stability in the presence of thiol ligands.

Acknowledgements

Authors are grateful for the financial support from Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC, UdelaR) awarded to S.B, Fondo Clemente Estable (FCE, ANII) awarded to E.M., PEDECIBA awarded to S.B. and E.M. The Laboratorio de Biomateriales belongs to the Centro Interdisciplinario de Química y Física de los Materiales (CSIC, UdelaR). We also want to acknowledge useful comments and suggestions from anonymous referees.

References

- [1] P. Li, X.B. Feng, G.L. Qiu, L.H. Shang, Z.G. Li, *J. Hazard. Mater.* 168 (2009) 591–601.
- [2] M. Morita, J. Yoshinaga, J.S. Edmonds, *Pure Appl. Chem.* 70 (1998) 1585–1615.
- [3] E. Méndez, H. Giudice, A. Pereira, G. Inocente, D. Medina, *J. Food Comp. Anal.* 14 (2001) 453–460.
- [4] E. Méndez, H. Giudice, A. Pereira, G. Inocente, D. Medina, *J. Food Comp. Anal.* 14 (2001) 547–549.
- [5] M. Korbas, J.L. O'Donoghue, G.E. Watson, I.J. Pickering, S.P. Singh, G.J. Myers, T.W. Clarkons, G.N. George, *ACS Chem. Neurosci.* 1 (2010) 810–818.
- [6] S.A. Counter, L.H. Buchanan, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 198 (2004) 209–230.
- [7] L. Magos, T.W. Clarkson, *Ann. Clin. Biochem.* 43 (2006) 257–268.
- [8] G.P. Guzzi, C.A.M. La Porta, *Toxicology* 244 (2008) 1–12.
- [9] T.W. Clarkson, *J. Trace Elem. Exp. Med.* 8 (1998) 303–317.
- [10] J.P.K. Rooney, *Toxicology* 234 (2007) 145–156.
- [11] Anonymous, Environmental Protection Agency, EPA Method 7472 (Vol. April 4, 2013), 1997.

- [12] T. Syversen, P. Kaur, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 26 (2012) 215–226.
- [13] M. Horvat, *Dynamics of Mercury Pollution on Regional and Global Scales*, Springer US, 2005, pp. 153–190.
- [14] H.N. Kim, W.X. Ren, J.S. Kim, J. Yoon, *Chem. Soc. Rev.* 41 (2012) 3210–3244.
- [15] E.M. Nolan, S.J. Lippard, *Chem. Rev.* 108 (2008) 3443–3480.
- [16] K. Scida, P.W. Stege, G. Haby, G.A. Messina, C.D. Garcia, *Anal. Chim. Acta* 691 (2011) 6–17.
- [17] S. Tokonami, Y. Yamamoto, H. Shiigi, T. Nagaoka, *Anal. Chim. Acta* 716 (2012) 76–91.
- [18] M. Li, H. Gou, I. Al-Ogaidi, N. Wu, *ACS Sustainable Chem. Eng.* (2013), <http://dx.doi.org/10.1021/sc400019a>.
- [19] G. Aragay, J. Pons, A. Merkoci, *Chem. Rev.* 111 (2011) 3433–3458.
- [20] K. Saha, S.S. Agasti, C. Kim, X. Li, V.M. Rotello, *Chem. Rev.* 112 (2012) 2739–2779.
- [21] X. Wang, L. Andrews, S. Riedel, M. Kaupp, *Angew. Chem. Int. Ed.* 46 (2007) 8371–8375.
- [22] J. Anichina, Z. Dobrusin, D.K. Bohme, *J. Phys. Chem. B* 114 (2010) 15106–15112.
- [23] I. Persson, L. Eriksson, P. Lindqvist-Reis, P. Persson, M. Sandström, *Chem. Eur. J.* 14 (2008) 6687–6696.
- [24] I. Persson, *Pure Appl. Chem.* 82 (2010) 1901–1917.
- [25] H.-C. Tai, C. Lim, *J. Phys. Chem. A* 110 (2005) 452–462.
- [26] B.V. Cheesman, A.P. Arnold, D.L. Rabenstein, *J. Am. Chem. Soc.* 110 (1988) 6359–6364.
- [27] R.G. Pearson, *J. Am. Chem. Soc.* 85 (1963) 3533–3539.
- [28] M. Stobiecka, A.A. Molinero, A. Chalupa, M. Hapel, *Anal. Chem.* 84 (2012) 4970–4978.
- [29] Y. Miyake, H. Togashi, M. Tashiro, H. Yamaguchi, S. Oda, M. Kudo, Y. Tanaka, Y. Kondo, R. Sawa, T. Fujimoto, T. Machinami, A. Ono, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 2172–2173.
- [30] H. Miyachi, T. Matsui, Y. Shigeta, K. Hirao, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 12 (2010) 909–917.
- [31] S. Bagchi, D. Mandal, D. Ghosh, A.K. Das, *Chem. Phys.* 400 (2012) 108–117.
- [32] T. Uchiyama, T. Miura, H. Takeuchi, T. Dairaku, T. Komuro, T. Kawamura, Y. Kondo, L. Benda, V. Sychrovsky, P. Bour, I. Okamoto, A. Ono, Y. Tanaka, *Nucleic Acids Res.* 40 (2012) 5766–5774.
- [33] J.-S. Lee, M.S. Han, C.A. Mirkin, *Angew. Chem. Int. Ed.* 46 (2007) 4093–4096.
- [34] D.v. Lierop, Ž. Krpetić, L. Guerrini, I.A. Larmour, J.A. Dougan, K. Faulds, D. Graham, *Chem. Commun.* 48 (2012) 8192–8194.
- [35] I. Ojea-Jiménez, X. López, J. Arbiol, V. Puentes, *ACS Nano* 6 (2012) 2253–2260.
- [36] K.V. Katok, R.L. Whitby, T. Fukuda, T. Maekawa, I. Bezverkhy, S.V. Mikhailovsky, A.B. Cundy, *Angew. Chem. Int. Ed.* 51 (2012) 2632–2635.
- [37] L. Katsikas, M. Gutiérrez, A. Henglein, *J. Phys. Chem.* 100 (1996) 11203–11206.
- [38] A. Henglein, C. Brancewicz, *Chem. Mater.* 9 (1997) 2164–2167.
- [39] T. Morris, H. Copeland, E. McLinden, S. Wilson, G. Szulczewski, *Langmuir* 18 (2002) 7261–7264.
- [40] E. Sumesh, M.S. Bootharaju, A.T. Pradeep, *J. Hazard. Mater.* 189 (2011) 450–457.
- [41] Y. Fan, Z. Liu, L. Wang, J. Zhan, *Nanoscale Res. Lett.* 4 (2009) 1230–1235.
- [42] N. Pradhan, A. Pal, T. Pal, *Colloids Surf. A* 196 (2002) 247–257.
- [43] G.V. Ramesh, T.P. Radhakrishnan, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 3 (2011) 988–994.
- [44] L.P. Wu, H.W. Zhao, Z.H. Qin, X.Y. Zhao, W.D. Pu, *J. Anal. Meth. Chem.* 12 (2012) 856947–856952.
- [45] K. Farhadi, M. Forough, R. Molaei, S. Hajizadeh, A. Rafipour, *Sens. Actuators B* 161 (2012) 880–885.
- [46] L. Chen, X. Fu, W. Lu, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 5 (2013) 284–290.
- [47] G.-L. Wang, X.-Y. Zhu, H.-J. Jiao, Y.-M. Dong, Z.-J. Li, *Biosens. Bioelectron.* 31 (2012) 337–342.
- [48] D. He, S. Garg, T.D. Waite, *Langmuir* 28 (2012) 10266–10275.
- [49] M. Rex, F.E. Hernandez, A.D. Campiglia, *Anal. Chem.* 78 (2006) 445–451.
- [50] W. Chemnasiri, F.E. Hernandez, *Sens. Actuators B* 173 (2012) 322–328.
- [51] Y. Wang, Y.F. Li, J. Wang, Y. Sang, C.Z. Huang, *Chem. Commun.* 46 (2010) 1332–1334.
- [52] T. Placido, G. Aragay, J. Pons, R. Comparelli, M.L. Curri, A. Merkoci, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 5 (2013) 1084–1092.
- [53] N. Vasimalai, S.A. John, *Analyst* 137 (2012) 3349–3354.
- [54] N. Vasimalai, G. Sheeba, S.A. John, *J. Hazard. Mater.* 213–214 (2012) 193–199.
- [55] N. Vasimalai, S.A. John, *J. Mater. Chem. A* 1 (2013) 4475–4482.
- [56] X. Jiang, A. Yu, *Langmuir* 24 (2008) 4307–4309.
- [57] S. Botasini, E. Méndez, *J. Nanopart. Res.* (2013), <http://dx.doi.org/10.1007/s11051-013-1526-4>.
- [58] S. Botasini, E.A. Dalchiele, J.C. Benesh, E. Méndez, *J. Nanopart. Res.* 13 (2011) 2819–2828.
- [59] A. Ono, H. Togashi, *Angew. Chem. Int. Ed.* 43 (2004) 4300–4302.
- [60] R. Wilson, *Chem. Soc. Rev.* 37 (2008) 2028–2045.
- [61] P.V. Kamat, *J. Phys. Chem. B* 106 (2002) 7729–7744.
- [62] X. Zuo, H. Wu, J. Toh, S.F.Y. Li, *Talanta* 82 (2010) 1642–1646.
- [63] G. Liang, P. Zhang, H. Li, Z. Zhang, H. Chen, S. Zhang, J. Kong, *Anal. Chim. Acta* 726 (2012) 73–78.
- [64] X. Xu, J. Wang, K. Jiao, X. Yang, *Biosens. Bioelectron.* 24 (2009) 3153–3158.
- [65] J. Wu, L. Li, D. Zhu, P. He, Y. Fang, G. Cheng, *Anal. Chim. Acta* 694 (2011) 115–119.
- [66] H. Wang, Y. Wang, J. Jin, R. Yang, *Anal. Chem.* 80 (2008) 9021–9028.
- [67] H. Li, J. Zhai, J. Tian, Y. Luo, X. Sun, *Biosens. Bioelectron.* 26 (2011) 4656–4660.
- [68] Z.H. Wu, J.H. Lin, W.L. Tseng, *Biosens. Bioelectron.* 34 (2012) 185–190.
- [69] Z.Q. Tan, J.F. Liu, R. Liu, Y.G. Yin, G.B. Jiang, *Chem. Commun.* (2009) 7030–7032.
- [70] J. Duan, Z.Y. Guo, *Chin. Chem. Lett.* 23 (2012) 225–228.
- [71] Z. Guo, J. Duan, F. Yang, M. Li, T. Hao, S. Wang, D. Wei, *Talanta* 93 (2012) 49–54.
- [72] Y. He, X. Zhang, K. Zeng, S. Zhang, M. Baloda, A.S. Gurung, G. Liu, *Biosens. Bioelectron.* 26 (2011) 4464–4470.
- [73] J. Lee, C.A. Mirkin, *Anal. Chem.* 80 (2008) 6805–6808.
- [74] T.A. Taton, C.A. Mirkin, R.L. Letsinger, *Science* 289 (2000) 1757–1759.
- [75] P. Fanjul-Bolado, D. Hernández-Santos, P.J. Lamas-Ardisana, A. Martín-Pernía, A. Costa-García, *Electrochim. Acta* 53 (2008) 3635–3642.
- [76] R.O. Kadara, N. Jenkinson, C.E. Banks, *Sens. Actuators B* 138 (2009) 556–562.
- [77] E. Bernalte, C. Marín Sánchez, E. Pinilla Gil, *Sens. Actuators B* 161 (2012) 669–674.
- [78] M. Zhang, L. Ge, S. Ge, M. Yan, J. Yu, J. Huang, S. Liu, *Biosens. Bioelectron.* 41 (2013) 544–550.
- [79] Z. Zhu, Y. Su, J. Li, D. Li, J. Zhang, S. Song, Y. Zhao, G. Li, C. Fan, *Anal. Chem.* 81 (2009) 7660–7666.
- [80] D. Martín-Yerga, M.B. González-García, A. Costa-García, *Sens. Actuators B* 165 (2012) 143–150.
- [81] L. Rassaei, M. Amiri, C.M. Cirtui, M. Sillanpää, F.M.M. Sillanpää, *Trends Anal. Chem.* 30 (2011) 1704–1715.
- [82] P. Miao, L. Liu, Y. Li, G. Li, *Electrochem. Commun.* 11 (2009) 1904–1907.
- [83] E.M. Fernández, L.C. Balbás, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 13 (2011) 20863–20870.
- [84] W. Tan, M. Radhi, M. Ab-Rahman, A. Kassim, *Aust. J. Basic Appl. Sci.* 5 (2011) 2475–2481.
- [85] K. Leopold, M. Foulkes, P. Worsfold, *Anal. Chim. Acta* 663 (2010) 127–138.
- [86] N.L. Anderson, N.G. Anderson, *Mol. Cell. Proteomics* 1 (2002) 845–867.
- [87] E.E. Miller, P.M. Grant, R. Kishore, F.J. Steinkruger, F.S. Rowland, V.P. Guinn, *Science* 175 (1972) 1121–1122.
- [88] L.S. Clesceri, A.E. Greenberg, A.D. Eaton, *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, 1999.
- [89] M.A. Augelli, R.A.A. Munoz, E.M. Richter, M.I. Cantagallo, L. Angnes, *Food. Chem.* 101 (2007) 579–584.
- [90] S.V. Mattigod, G.E. Fryxell, R. Skaggs, K.E. Parker, *Prepr. Pap. Am. Chem. Soc. Div. Fuel Chem.* 49 (2004) 287–288.
- [91] C. Delacôte, F.O.M. Gaslain, B. Lebeau, A. Walcarius, *Talanta* 79 (2009) 877–886.
- [92] L. Sun, A. Zhang, S. Su, H. Wang, J. Liu, J. Xiang, *Chem. Phys. Lett.* 517 (2011) 227–233.
- [93] W. Yantasee, Y. Lin, T.S. Zemanian, G.E. Fryxell, *Analyst* 128 (2003) 467–472.
- [94] A.J. Tchinda, E. Ngameni, A. Walcarius, *Sens. Actuators B* 121 (2007) 113–123.
- [95] H. Nacer, L. Bouzenada, I. Hafaieth, R. Kherrat, L. Hamlaoui, R. Touzani, N. Jaffrezic-Renault, *J. Mater. Environ. Sci.* 3 (2012) 846–855.
- [96] A.A. Ensafi, A.R. Allafchian, M. Saraji, B. Farajmand, *Talanta* 99 (2012) 335–341.
- [97] S. Botasini, E. Méndez, in: J.N. Govil (Ed.), *Nanotechnology. Energy and Environment*, 6, Studium Press LLC, Houston, 2012, pp. 251–264.
- [98] L.V. Stebounova, E. Guio, V.H. Grassian, *J. Nanopart. Res.* 13 (2011) 233–244.
- [99] P. Cardiano, G. Falcone, C. Foti, S. Sammartano, *J. Chem. Eng. Data* 56 (2011) 4741–4750.
- [100] M.A. Vairavamurthy, B. Manowitz, D. Maletic, H. Wolfe, *Org. Geochem.* 26 (1997) 577–585.
- [101] K. Mopper, B.F. Taylor, *ACS Symp. Ser.* 305 (1986) 324–329.
- [102] W. Dong, Y. Bian, L. Liang, B. Gu, *Environ. Sci. Technol.* 45 (2011) 3576–3583.
- [103] S. Gao, X. Jia, Y. Chen, *J. Nanopart. Res.* (2013), <http://dx.doi.org/10.1007/s11051-012-1385-4>.
- [104] Y. Du, R. Liu, B. Liu, S. Wang, M.Y. Han, Z. Zhang, *Anal. Chem.* 85 (2013) 3160–3165.

Silver Nanoparticles in Real Environments

SANTIAGO BOTASINI AND EDUARDO MÉNDEZ¹

ABSTRACT

Proper application of silver nanoparticles requires the knowledge of their behavior in real environments. For such goal, effective control of the processes of dissolution, aggregation and reactivity in relation to medium composition led to optimization of the application, as well to the control of possible ecotoxicological issues. The three mentioned processes, followed by simple absorptiometry in the UV-Vis-NIR range of the aggregation process, yields valuable a complete information that can be interpreted in the framework of a thermodynamic-based model. The Gibbs energy for the aggregation process and its dependence on the medium composition contains all the information needed to understand and control de fate of silver nanoparticles in real environments.

Key words: Aggregation, Dissolution, Silver nanoparticles, Thermodynamics

1. INTRODUCTION

Silver nanoparticles (AgNPs) are being increasingly incorporated as a broad-spectrum antimicrobial agent in different consumer products including textiles, cosmetics, fabrics and plastics. Such direct contact with the consumer has not encompassed ecotoxicological studies (Fabrega *et al.*, 2011; Marambio-Jones and Hoek, 2010; Majestic *et al.*, 2010) or social education/information (Fauce and Watal, 2010), leading to reasonable and justified concerns about potential adverse effects on human health and the environment (Quadros and Marr, 2011). In addition, the development of analytical applications for AgNPs, which includes nanoelectronics/biosensing,

Laboratorio de Biomateriales, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, 11400 Montevideo, Uruguay.

Corresponding author: E-mail: emendez@fcien.edu.uy

surface enhanced Raman spectroscopy and optical sensors (Thompson *et al.*, 2008; Bakr *et al.*, 2009; Charles *et al.*, 2009), may be seriously affected when applied in real environments if the media is not considered in their design.

Proper application developments of AgNPs should take into account their behavior in aqueous solutions, implying the knowledge of the impact of nanoparticle dissolution, aggregation, and reactivity, both from the thermodynamic and kinetic points of view. Such processes are mutually affected by different factors (Table 1) which have been acknowledged by the recent research on this topic.

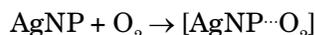
Table 1: Intrinsic and Extrinsic factors affecting AgNPs fate in real Environments

<i>Process</i>	<i>Intrinsic factors</i>	<i>Extrinsic factors</i>
Dissolution	<ul style="list-style-type: none"> o Size and shape o Surface coating o Aggregation state 	<ul style="list-style-type: none"> o Solution composition: oxidants
Aggregation	<ul style="list-style-type: none"> o Surface coating 	<ul style="list-style-type: none"> o Solution composition: ionic strength
Chemical reactivity	<ul style="list-style-type: none"> o Redox state of surface atoms o Ratio surface area/volume 	<ul style="list-style-type: none"> o Solution composition: ions, ligands, etc.

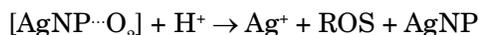
Commercial AgNPs are stabilized by various types of organic coatings, which provide electrostatic, steric or electrosteric stabilization against aggregation in aqueous solutions (Badway *et al.*, 2010). Citrate, polyvinylpyrrolidone (PVP) and cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) are the most common examples of these three stabilization agents (Tolaymat *et al.*, 2010). In some cases, the reductant itself employed during AgNPs synthesis also act as stabilizing agents, like H_2 or $NaBH_4$, yielding the so-called “naked nanoparticles”, which are probably covered by H atoms or BH_4^-/BO_2^- anions, respectively (Botasini and Méndez, 2012). Silver nanoparticles synthesized in basic media are covered by a thin layer of Ag_2O , *i.e.*, covered by covalently attached oxo groups. In nanobiomedicine applications, the stabilization layer may be designed to reach a specific target (protein, cellular membrane, etc.). In addition, the strength of the stabilization layer attachment controls the dissolution of AgNPs and the bioavailability of Ag^+ ions. For those applications involving antibacterial activity of AgNPs, the controlled release of Ag^+ ions is the key factor to the success, establishing the limit between ecotoxicity and disinfection efficacy (Xiu *et al.*, 2011).

Independently of the application for which the AgNPs were designed, its fate in real media will define the success of the application. Dissolution, aggregation and chemical reactivity are the main physicochemical processes affecting AgNPs stability; once the stabilized AgNPs enters the real medium, pH, ionic strength, and medium composition determine the ultimate fate of AgNPs.

The dissolution of AgNPs is an oxidative process induced by dissolved oxygen in the aqueous media (Ma *et al.*, 2012). The overall reaction is a multi-step process (Liu *et al.*, 2010), involving the formation of an oxygen chemisorbed complex on the AgNP surface:



followed by the oxidation of surface Ag atoms concomitant with the formation of reactive oxygen species (ROS):



The main result of the oxidative dissolution of AgNPs is the formation of ROS and Ag⁺ ions, along with the remains of the AgNP. Hence, the ultimate fate of AgNPs in real environments will depend on the different reactions taking place between the different products and media components.

The thermodynamic feasibility of the oxidative dissolution is supported by the standard potential values for the species involved: $E^\circ \text{Ag}^+/\text{Ag}^\circ = 0.799$ V and $E^\circ \text{O}_2/\text{H}_2\text{O} = 1.23$ V (Liu and Hurt, 2010). Silver ions produced by oxidation are immediately adsorbed onto the AgNP surface (Liu *et al.*, 2010), size dependent-process involving the free nanoparticle surface space available for adsorption. In the presence of inorganic anions usually present in natural environments, like chloride, phosphate, sulfide, sulphate and carbonate, some insoluble silver compounds forms, inducing nanoparticle precipitation (Xiu *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011). Additionally, organic compounds present in environmental samples, either naturally or as a contaminant, also form complexes with silver ions, changing the bioavailability of the latter (Xiu *et al.*, 2011).

The mutual interdependence between the different factors difficult the rationalization of the whole process. It is, however, highly desirable to have a model that allow to predict the behavior of AgNPs in real media. Having this in mind, we present a new model based on pure thermodynamic considerations to account for the different effects of real media in the stability of silver nanoparticles.

2. EXPERIMENTAL ISSUES

The interdependence between the different factors that affect nanoparticle stability has the advantage that a simple analytical methodology that follows the aggregation process is usually enough to take into account the diversity of medium conditions that produce the aggregation. Hydrodynamic diameter determination by dynamic light scattering measurements (Zhang *et al.*, 2011), nanoparticle tracking analysis (Piccapietra *et al.*, 2012), and UV-Vis absorbance (Zook *et al.*, 2011) have been proposed as useful techniques to determine AgNPs in isolated and aggregated states.

Electronic absorption spectroscopy in the UV-Vis-NIR wavelength range yields quantitative results for isolated and aggregated states provided AgNPs have a quasi-spherical shape (Botasini *et al.*, 2011). The plasmon resonance band centered at *ca.* 400 nm is characteristic of spherical AgNPs (Fig. 1, red line). Upon aggregation by 100 mM NaCl induction, the plasmon band decreases considerably, with the simultaneous increase of a wide absorption band extending from 700 nm and beyond (Fig. 1, blue line). It is noteworthy the absence of absorption in the latter wavelength range for isolated AgNPs, thus providing a simple analytical tool to follow the aggregation process.

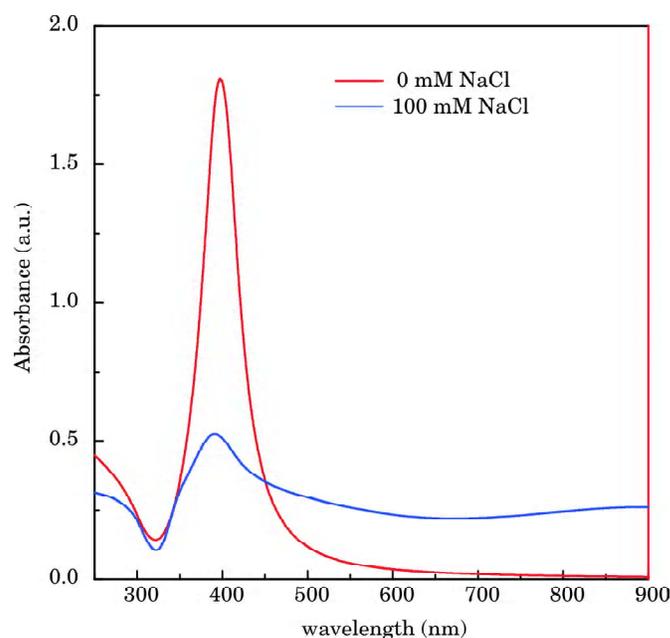


Fig. 1: UV-Vis-NIR absorption spectra of starch-covered AgNPs isolated (red) or aggregated in the presence of 100 mM NaCl (blue).

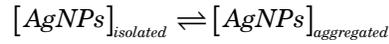
3. A THERMODYNAMIC-BASED APPROACH TO RATIONALIZE AgNPs AGGREGATION

Taking into account the diversity of factors that determine the fate of AgNPs in real environments, it is desirable to have unified criteria to rationalize the increasing amount of data. First, we must acknowledge the fact that there are thermodynamic and kinetic aspects related to the aggregation process. The last one will not be considered in this work, and we will consider only the initial and final equilibrium states of AgNPs in real environments. Hence, based on the Ockham rule, the thermodynamic approach will consider an initial and final equilibrium states, linked by a process. The initial state is characterized by isolated nanoparticles forming a stable colloidal solution due to the presence of a protective layer surrounding

them. The final state is characterized by aggregated AgNPs in the real media considered. The process responsible for the change from the initial to the final states is the nanoparticle aggregation. Such process will be characterized by thermodynamic functions of state as the Gibbs energy.

3.1. The Mathematical Model

The initial and final states of the system are linked by equilibrium of the type:



numerically characterized by a constant value at a given temperature. As the equilibrium position is determined by the nature of the covering agent and the medium composition, the equilibrium constant will depend not only on the temperature (T), but also on extrinsic factors responsible for the aggregation, like the capping agent (CA) and some parameter characterizing the medium that we will name “medium factor” (MF). Among the latter, the ionic strength, the presence of certain ions or organic ligands, are the main ones to consider. In this regard, the equilibrium constant is actually an apparent equilibrium constant, which we will denote as $K_{T,MF}^{CA}$:

$$K_{T,MF}^{CA} = \frac{f_{aggregated}}{f_{isolated}} = \frac{1 - f_{isolated}}{f_{isolated}} \quad (\text{Eq 1})$$

where f represents the molar fraction. The apparent equilibrium constant is related with the Gibbs energy for the aggregation process (ag) at the given experimental conditions:

$$\Delta_{ag} G_{T,MF}^{CA} = \diamond RT \ln(K_{T,MF}^{CA}) \quad (\text{Eq 2})$$

Above a certain level for the medium factor concentration responsible for the nanoparticle aggregation (critical concentration), the equilibrium position will be displaced to the right, $K_{T,MF}^{CA} > 0$ and $\Delta_{ag} G_{T,MF}^{CA} < 0$, that is, the aggregation process will be thermodynamically favored. On the contrary, below the medium factor critical concentration, no aggregation process will take place, and the colloidal nanoparticle solution will be stable in such conditions.

The mathematical dependence between the Gibbs energy for the aggregation process and the medium factor concentration could be experimentally determined, and the extrapolation would yield a specific value for the Gibbs energy that is valid in the absence of the medium factor (null concentration): $\Delta_{ag} G_{T,MF=0}^{CA}$. A linear relationship is the simplest one, and this Gibbs energy value may contain all the information related to the

effect of the medium conditions in the stability of colloid nanoparticle solutions. The linear extrapolation method (LEM) yields the numerical value for this Gibbs energy:

$$\Delta_{ag} G_{T, MF}^{CA} = \Delta_{ag} G_{T, MF=0}^{CA} + m C_{MF} \quad (\text{Eq 3})$$

where m is the coefficient of the fitted line and C_{MF} is the medium factor concentration. When the medium factor concentration correspond to the critical value $C_{MF} = C_{MF}^{crit}$, the apparent equilibrium constant $K_{T, MF}^{CA} = 1$, $\Delta_{ag} G_{T, MF}^{CA} = 0$ and $\Delta_{ag} G_{T, MF=0}^{CA} = m C_{MF}^{crit}$. Hence, Eq 3 can be also expressed as:

$$\Delta_{ag} G_{T, MF}^{CA} = m(C_{MF}^{crit} - C_{MF}) \quad (\text{Eq 4})$$

Combining Eqs 1 and 2, and rearranging, the mathematical expression for the molar fraction of isolated AgNPs is obtained:

$$f_{isolated} = \frac{1}{1 + \exp\left(-\frac{\Delta_{ag} G_{T, MF}^{CA}}{RT}\right)} \quad (\text{Eq 5})$$

This molar fraction is readily measured by UV-Vis-NIR spectroscopy at *ca.* 400 nm. Substituting Eq 4 into Eq 5 we finally obtain:

$$f_{isolated} = \frac{1}{1 + \exp\left[-\frac{m(C_{MF}^{crit} - C_{MF})}{RT}\right]} \quad (\text{Eq 6})$$

3.2. The Fitting Model

The Boltzmann expression for the sigmoid curve is:

$$f(x) = \frac{A1 - A2}{1 + \exp\left[-\frac{(x_0 - x)}{d}\right]} + A2 \quad (\text{Eq 7})$$

with a clear resemblance with Eq 6 for $A1 = 1$ and $A2 = 0$.

The gradual change in the fitting parameters allows assigning their effect on the plot profile. The plot moves toward higher values of x when x_0 is increased (Fig 2a), while the increase in the parameter d led to a decrease in the slope at the inflection point (Fig 2b). The mutual dependence between the different parameters is evident looking at the different profiles that are obtained by keeping constant the ratio x_0/d (Fig 2c).

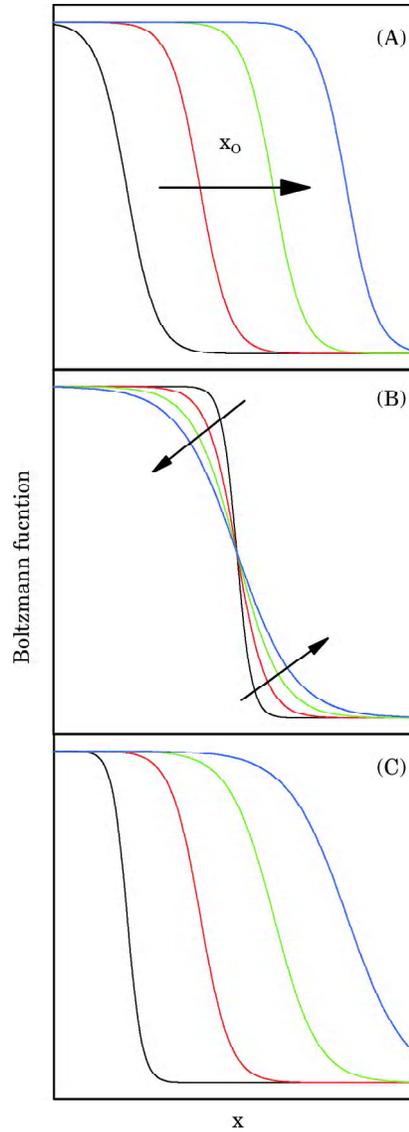


Fig. 2: Effect of fitting parameters in Boltzmann function. (a) increase of x_0 keeping d constant, (b) increase of d keeping x_0 constant, and (c) four plots having equal value of x_0/d ratio

3.3. Interpretation of the Fitting Parameters

By fitting the Boltzmann expression to the experimental data, *i.e.* Absorbance at *ca.* 400 nm for the isolated fraction of AgNPs *vs.* medium factor concentration, the values for C_{MF}^{crit} , m , and $\Delta_{ag} G_{T,MF=0}^{CA}$ can be obtained (Table 2).

Table 2: Relationship between fitting parameters obtained from Boltzmann equation and the thermodynamic model parameters

<i>Model parameter</i>	<i>Calculation from fitting parameters</i>
C_{MF}^{crit}	x_0
m	$(RT)/d$
$\Delta_{ag} G_{T,MF=0}^{CA}$	$(RT)x_0/d$
y'	$(A1-A2)/4d$

$R = 8.314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ is the gas constant, T is the temperature in K

The fitting parameter x_0 is easily recognizable as the model parameter C_{MF}^{crit} . On the other hand, the model parameter m , which is just an experimental coefficient relating the Gibbs energy and the medium factor concentration, is inversely related to the fitting parameter d , which at the same time, is inversely related to y' , the slope at the inflection point of the Boltzmann curve (Table 2). Hence, a direct relationship exists between y' and m , suggesting that the physical interpretation of m relies on the gradualism of the transition between the isolated nanoparticles and the aggregated one: a large value of m is related to a sudden transition from the isolated to aggregated states. Finally, it is interesting to notice that the ratio x_0/d is related to the Gibbs energy for the aggregation process (Table 2), indicating that this thermodynamic property contains all the relevant information relating the aggregation process.

3.4. Experimental Test of the Model

In order to experimentally test the proposed model, we have chosen four different capping agents for AgNPs, covering the different possible interactions: citrate anion (electrostatic), starch (steric), sodium bis(2-ethylhexyl) sulfosuccinate, NaAOT (electrosteric), and 2-thiobarbituric acid, TBA (covalent). The as-prepared AgNPs were exposed to increased concentration of different inorganic salts, and the concentration of isolated AgNPs was followed by UV-Vis-NIR spectrometry at 400 nm. All experiments were conducted at 298 K in the dark. In all cases, data nicely adjusted to the Boltzmann equation, indicating that the proposed thermodynamic model could explain the experimental observations.

The aggregation profile for NaAOT covered AgNPs in the presence of different sodium salts in solution (Fig. 3) show sigmoid shapes for all the anions considered except nitrate, indicating that the process is spontaneous in the whole mM range analyzed, and probably the colloidal solution is unstable at the micromolar range.

The values for $\Delta_{ag} G_{T,MF=0}^{CA}$ increase in the order $\text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{F}^-$ (Table 3). This order is inversely related with the ratio charge/size of the ions, indicating

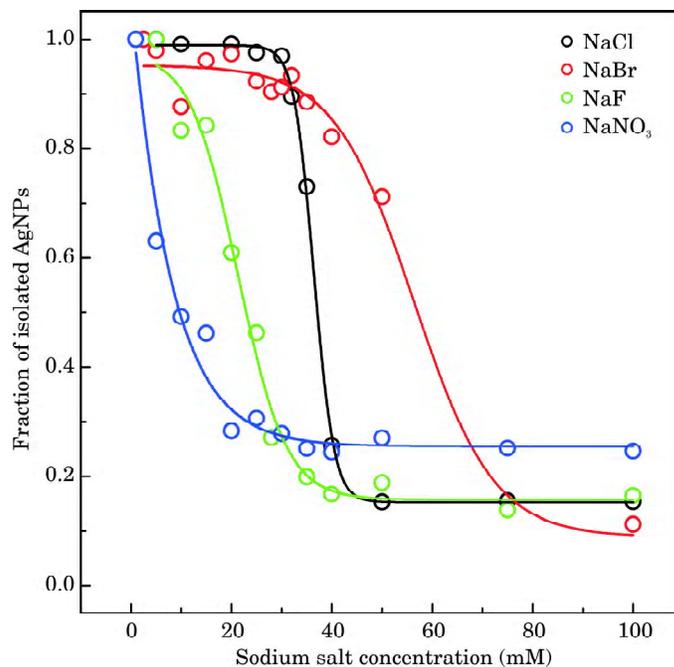


Fig. 3: Fraction of isolated AgNPs covered with NaAOT, in the presence of NaCl, NaBr, NaF and NaNO_3 at concentrations in the 1–100 mM range, fitted to the Boltzmann function (Eq 7).

Table 3: Calculated model parameters calculated from the Boltzmann fitted parameters for NaAOT covered AgNPs in the presence of different sodium salts in the concentration range 0–100 mM.

<i>Medium factor</i>	<i>Boltzmann fitted parameters</i>	<i>Model calculated parameters</i>
NaCl	$A1 = 0.989 \pm 0.005$	$C_{MF}^{crit} = 36.4 \text{ mM}$
	$A2 = 0.152 \pm 0.006$	$m = 1304 \text{ J mol}^{-1} \text{ mM}^{-1}$
	$x_0 = 36.4 \pm 0.1$	$y' = 0.110 \text{ mM}^{-1}$
	$d = 1.9 \pm 0.1$	$\Delta_{ag} G_{T,MF=0}^{CA} = 47.4 \text{ kJ mol}^{-1}$
NaBr	$A1 = 0.95 \pm 0.02$	$C_{MF}^{crit} = 56 \text{ mM}$
	$A2 = 0.09 \pm 0.04$	$m = 310 \text{ J mol}^{-1} \text{ mM}^{-1}$
	$x_0 = 56 \pm 2$	$y' = 0.026 \text{ mM}^{-1}$
	$d = 8.0 \pm 1.5$	$\Delta_{ag} G_{T,MF=0}^{CA} = 17.3 \text{ kJ mol}^{-1}$
NaF	$A1 = 0.98 \pm 0.05$	$C_{MF}^{crit} = 21.3 \text{ mM}$
	$A2 = 0.16 \pm 0.02$	$m = 516 \text{ J mol}^{-1} \text{ mM}^{-1}$
	$x_0 = 21.3 \pm 1.1$	$y' = 0.043 \text{ mM}^{-1}$
	$d = 4.8 \pm 0.8$	$\Delta_{ag} G_{T,MF=0}^{CA} = 11.0 \text{ kJ mol}^{-1}$
NaNO3	not determined	$\Delta_{ag} G_{T,MF=0}^{CA} < 0$

that the electrosteric stabilization provided by NaAOT agent is affected by the size of the anion rather than by the solution ionic strength. On the other hand, the critical concentration of salts is higher for NaBr, but the process begins smoothly at lower concentration, in accordance with the low value of m . In conclusion, bromide and fluoride anions are able to induce aggregation at lower concentrations than chloride, but in the case of fluoride, the transition is sharper, thus determining the lower critical concentration for the aggregation process. NaAOT results the better stabilizing agent for AgNPs in the case of the presence of chloride anions, as the aggregation process takes place in a limited concentration range.

On the other hand, chloride anions provide an interesting contrasting example, as they are able to form AgCl on the AgNP surface, as demonstrated by XRD and electrochemical measurements (Botasini and Méndez, 2012b). The formation of AgCl induces *per se* the aggregation of nanoparticles. Moreover, the silver speciation diagram (Fig. 4) shows that depending on the concentration, chloride silver complexes of the type $AgCl_n^{1-n}$ ($n > 1$) may also form, promoting AgNPs aggregation (Fig. 5).

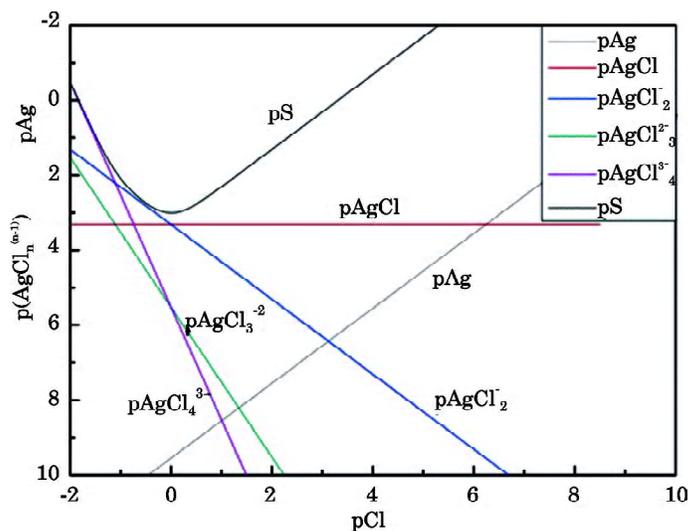


Fig. 4: Silver speciation diagram in chloride media

Hence, chloride anion constitutes a special case explaining the stability of AgNPs. It is interesting to check the proposed thermodynamic model in chloride solutions assessing the effectiveness of different capping agents in preventing aggregation. In this case, all the aggregation profiles adjust to the Boltzmann model (Fig 6).

The values for $\Delta_{ag} G_{T,MF=0}^{CA}$ increase in the order NaAOT > TBA > sodium citrate > starch (Table 4), suggesting that electrosteric and covalent

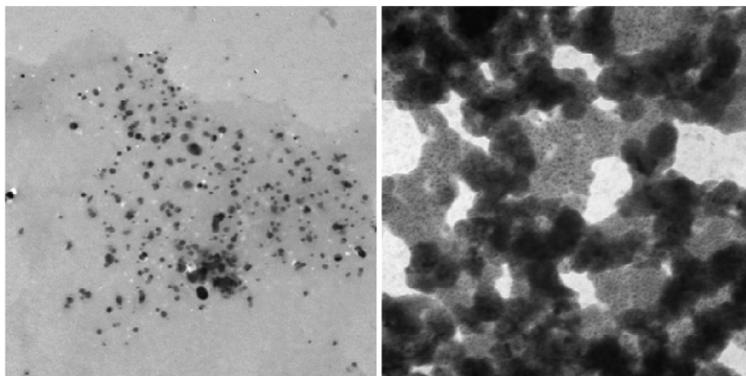


Fig. 5: Transmission Electron micrographs for isolated starch-covered AgNPs (left) and aggregated ones by induction with 100 mM NaCl (right).

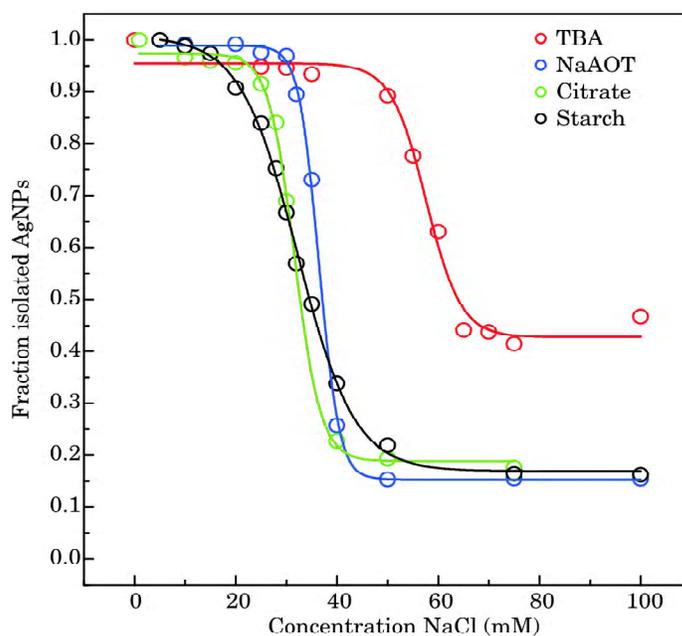


Fig. 6: Fraction of isolated AgNPs covered with different capping agents, in the presence of NaCl concentrations in the 1–100 mM range, fitted to the Boltzmann function (Eq 7).

interactions are equally effective in protecting against aggregation. A detailed analysis show that the aggregation process is smoother for TBA than for NaAOT, as deduced from the m values, but the critical concentration is higher for TBA. As the adsorption of TBA on AgNPs takes place by a surface chelate (Botasini *et al.*, 2011), it is reasonable to assume that TBA cannot

Table 4: Calculated model parameters calculated from the Boltzmann fitted parameters for AgNPs covered with different capping agents in the presence of NaCl in the concentration range 0–100 mM.

<i>Capping agent</i>	<i>Fitted Boltzmann parameters</i>	<i>Calculated model parameters</i>
TBA (thiobarbituric acid)	A1 = 0.95 ± 0.02 A2 = 0.43 ± 0.02 x _o = 57.5 ± 0.8 d = 3.4 ± 0.7	m = 729 y' = 0.038 $\Delta_{ag} G_{T,MF=0}^{CA} = 41.9 \text{ kJ mol}^{-1}$
NaAOT (sodium bis(2-ethylhexyl) sulfosuccinate)	A1 = 0.989 ± 0.005 A2 = 0.152 ± 0.006 x _o = 36.4 ± 0.1 d = 1.9 ± 0.1	m = 1304 y' = 0.110 $\Delta_{ag} G_{T,MF=0}^{CA} = 47.4 \text{ kJ mol}^{-1}$
Sodium citrate	A1 = 0.97 ± 0.01 A2 = 0.19 ± 0.01 x _o = 31.6 ± 0.4 d = 2.6 ± 0.3	m = 953 y' = 0.075 $\Delta_{ag} G_{T,MF=0}^{CA} = 30.1 \text{ kJ mol}^{-1}$
Starch	A1 = 1.00 ± 0.01 A2 = 0.17 ± 0.01 x _o = 32.1 ± 0.3 d = 5.6 ± 0.3	m = 442 y' = 0.037 $\Delta_{ag} G_{T,MF=0}^{CA} = 14.2 \text{ kJ mol}^{-1}$

cover part of the surface, providing free space for chloride adsorption and AgCl formation.

4. CONCLUSIONS

A simple thermodynamic model that takes into account only the initial isolated state of and the final aggregated state of silver nanoparticles is sufficient to take into account the different factors, including environmental relevant ones, associated to the aggregation process. This process was selected because is key in the determination of the fate of silver nanoparticles, as include common events as dissolution and chemical reactivities. Additionally, the model also allows the interpretation of silver nanoparticle interactions in the presence of chloride, a relevant and ubiquitous anion in environmental samples. In brief, the thermodynamic model yields a Gibbs energy value for the aggregation process that includes all relevant information related to extrinsic factor that determines the disruption of the stability of isolated nanoparticles. In addition, the process is also related to the relative strength and protecting action of the capping agent, as well as to the smoothness of the transition range. We believe that extensive Tables containing Gibbs energy for different capping agents and medium factor will contribute to the prediction of the ultimate fate of silver nanoparticles in real environments.

ACKNOWLEDGEMENTS

Financial support for this work was provided by PEDECIBA, ANII and CSIC (Uruguay) through scholarships and projects awarded to the authors.

REFERENCES

- Bakr, O.M., Amendola, V., Aikens, C.M., Wenseleers, W., Li, R., Dal Negro, L., Schatz, G.C. and Stellacci, F. (2009). Silver nanoparticles with broad multiband linear optical absorption, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 48: 5921–5926.
- Bernd Nowack, H.F.K. and Height, M. (2011). 120 years of nanosilver history: Implications for policy makers.
- Botasini, S. and Méndez, E. (2012a). On the purity assessment of solid sodium borohydride, *J. Power Sources* 197: 218–223.
- Botasini, S. and Méndez, E. (2012b). Silver nanoparticles aggregation not-triggered by an ionic strength mechanism, *in preparation*
- Botasini, S., Dalchiele, E.A., Benech, J.C. and Méndez, E. (2011). Stabilization of triangular and hear-shaped plane silver nanoparticles using 2-thiobarbituric acid, *J. Nanopart. Res.*, 13: 2819–2828.
- Charles, D.E., Aherne, D., Gara, M., Ledwith, D.M., Gun'ko, Y.K., Kelly, J.M., Blau, W.J. and Brennan-Fournet, M.E. (2009). Silver nanoplates for highly sensitive plasma resonance sensing, *ACS Nano*, 4: 55–64.
- El Badawy, A.M., Luxton, T.P., Silva, R.G., Scheckel, K.G., Suidan, M.T. and Tolaymat, T.M. (2010). Impact of environmental conditions (pH, ionic strength, and electrolyte type) on the surface charge and aggregation of silver nanoparticles suspensions, *Environ. Sci. Technol.* 44: 1260–1266.
- Fabrega, J., Luoma, S.N., Tyler, C.R., Galloway, T.S. and Lead, J.R. Silver nanoparticles: behavior and effects in the aquatic environment. *Environ. Int.*, 37: 517–531.
- Fauce, T. and Watal, A. (2010). Nanosilver and global public health: international regulatory issues. *Nanomedicine*, 5: 617–632.
- Liu, J. and Hurt, R.H. (2010). Ion release kinetics and particle persistence in aqueous nano-silver colloids. *Environ. Sci. Technol.*, 44: 2169–2175.
- Liu, J., Sonshine, D.A., Shervani, S. and Hurt, R.H. (2010). Controlled release of biologically active silver from nanosilver surfaces, *ACS Nano*, 4: 6903–6913.
- Ma, R., Levard, C., Marinakos, S.M., Cheng, Y., Liu, J., Michel, F.M., Brown Jr., G.E. and Lowry, G.V. (2012). Size-controlled dissolution of organic-coated silver nanoparticles, *Environ. Sci. Technol.*, 46: 752–759.
- Majestic, B.J., Erdakos, G.B., Lewandowski, M., Oliver, K.D., Willis, R.D., Kleindienst, T.E. and Bhave, P.V. 2010. A review of selected engineered nanoparticles in the atmosphere, sources, transformations, and techniques for sampling and analysis. *Int. J. Occup. Environ. Health*, 16: 488–507.
- Marambio-Jones, C. and Hoek, E.M.V. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *J Nanopart Res.*, 12: 1531–1551.
- Piccapietra, F., Sigg, L. and Behra, R. (2012). Colloidal stability of carbonate-coated silver nanoparticles in synthetic and natural freshwater, *Environ. Sci. Technol.*, 46: 818–825.
- Quadros, M. E. and Marr, L. C. 2011. Silver nanoparticles and total aerosols emitted by nanotechnology-related consumer spray products, *Environ. Sci. Technol.*, 45: 10713–10719.
- Thompson, D.G., Enright, A., Faulds, K., Smith, W.E. and Graham, D. (2008). Ultrasensitive DNA detection using oligonucleotide-silver nanoparticle conjugates, *Anal. Chem.*, 80: 2805–2810.

- Toaymat, T.M., El Badawy, A.M., Genaidy, A., Scheckel, K.G., Luxton, T.P. and Suidan, M. (2010). An evidence-based environmental perspective of manufactured silver nanoparticle in syntheses and applications: A systematic review and critical appraisal of peer-reviewed scientific papers. *Sci. Total Environ.*, 408: 999–1006.
- Xiu, Z.-M., Ma, J. and Alvarez, P.J.J. (2011). Differential effect of common ligands and molecular oxygen on antimicrobial activity of silver nanoparticles versus silver ions. *Environ. Sci. Technol.*, 45: 9003–9008.
- Zhang, W., Yao, Y., Li, K., Huang, Y. and Chen, Y. (2011). Influence of dissolved oxygen on aggregation kinetics of citrate-coated silver nanoparticles, *Environ. Pollut.*, 159: 3757–3762.