



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Facultad de Ciencias Físico Matemáticas

Fabricación de los componentes de un sensor microfluídico de papel
para la detección de iones de arsénico

Tesis presentada al

Posgrado en Física Aplicada

Requisito para la obtención del grado de

Maestría en Ciencias Física Aplicada

Por

Esmeralda Aguilar Martinez

Asesorada por:

Dra. Claudia Oliva Mendoza Barrera
Dr. Víctor Manuel Altuzar Aguilar

Puebla, Pue. México

Octubre de 2023

Agradecimientos

A la Facultad de Ciencias Físico Matemáticas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por la formación que me brindó.

Al CONACYT, por la beca otorgada como apoyo financiero educativo de posgrado (CVU 1072925).

A la Dra. Claudia Oliva Mendoza Barrera del Laboratorio de Nanobiotecnología y al Dr. Víctor Manuel Altuzar Aguilar del Laboratorio de Biosensores de la FCFM-BUAP por su respaldo y asesoría en la realización de esta tesis.

Al Dr. Sergio Tomás Velázquez del Departamento de Física CINVESTAV-IPN por su colaboración en las mediciones de XPS.

Al Dr. Hiram Joazet Ojeda Galván y a la Dra. Mildred Quintana Ruiz de la UASLP por su colaboración en las mediciones de TEM.

Al M.C Josué F. Perzábal Domínguez y Fis. Emmanuel Tamariz López por su apoyo técnico.

A los profesores revisores de esta tesis.

Dedicatorias

A mis padres y hermanos por su cariño y apoyo incondicional.

A mis amigos, que hicieron que esta travesía fuera más divertida y un poco menos difícil.

A mis asesores, por toda la paciencia y apoyo brindado.

Y a mi familia, por confiar en mí.

Resumen

El arsénico es un constituyente natural del ambiente marino y de agua dulce. Generalmente se encuentran en concentraciones muy bajas, pero las actividades industriales o mineras han contribuido a alcanzar y rebasar los niveles de iones metálicos en los sistemas subterráneos de agua. Derivado de su incremento, su monitoreo a través de sensores es fundamental para determinar que su concentración se mantenga dentro de los niveles permitidos por normas nacionales e internacionales. Los dispositivos microfluídicos basados en papel tienen aplicaciones en la detección colorimétrica de metales pesados dado que cuentan con una plataforma de detección portátil, desechable, rápida y sensible. Por su parte, la colorimetría puede combinarse con la detección basada en nanopartículas metálicas bioconjugadas, dado que han mostrado la capacidad de emplearse como sensores del análisis de interés y su reconocimiento a simple vista.

En el presente trabajo para obtener el grado de Maestría se diseñó, fabricó y estudió la respuesta de los componentes de un sensor microfluídico de papel a iones As^{3+} . Para ello, se fabricaron nanorods de oro (AuNRs) por el método mediado por semillas. Las bandas plasmónicas localizadas LSPR transversal y longitudinal de los coloides de AuNRs, fueron determinadas en ~ 522 nm y ~ 653 nm, para una razón de aspecto ~ 2.4 y factor de calidad cercano a 10. La bioconjugación de los AuNRs se realizó empleando queratina, para su posterior empleo como nanosensores coloidales a diversas concentraciones de arsenito. Se determinó que la absorbancia, concentración elemental porcentual y ambiente químico cambian en muestras de coloides de nanorods de oro bioconjugados con queratina expuestos a 2, 4, 6, 8 y 50 $\mu\text{g/L}$ de As^{3+} . Entonces, pueden ser empleados como nanosensores de arsenito. Así mismo, se diseñaron y fabricaron μPADs impresos con cera sobre papel Whatman tipo 1, con zonas de sensado e inyección, en forma de estrella de 6 picos. Los sensores fabricados y sometidos a un tratamiento térmico permitieron la eliminación de fugas y una disminución en el ancho de barrera de hasta 0.1 mm y longitud de canal de 3 mm, en todos los colores empleados, salvo en la combinación CMYK (Cian, Magenta, Amarillo y Negro) (0, 0.502, 0.502, 0). Finalmente, se estableció la prueba de concepto del uso de un dispositivo experimental de lectura colorimétrica, a diferentes concentraciones de colorante vegetal azul absorbidas sobre papel tipo Whatman 1.

Palabras clave: *sensor microfluídico basado en papel, nanovarillas de oro, metales pesados, colorimetría, flujo capilar.*

Objetivos

Objetivo General

Diseñar, fabricar y estudiar la respuesta de los componentes de un sensor microfluídico de papel a iones As^{3+} .

Objetivos Específicos

1. Sintetizar nanovarillas de oro por el método de semilla con razón de aspecto entre 2 y 5.
2. Caracterizar las bandas plasmónicas localizadas de nanovarillas de oro con razón de aspecto entre 2 y 5, mediante espectroscopía UV-Vis y su morfología mediante microscopía electrónica de transmisión.
3. Bioconjugar los AuNRs sintetizados con terminales funcionales, y caracterizar sus propiedades ópticas y composicionales con espectroscopia UV-Vis y de fotoelectrones de rayos X.
4. Estudiar la respuesta plasmónica y superficial de AuNRs bioconjugados a soluciones de arsenito mediante espectroscopia UV-Vis y de fotoelectrones de rayos X.
5. Diseñar un patrón de canales micrométricos para la fabricación de un dispositivo portátil de papel, tal que incluya zonas de inyección, control negativo, control positivo y sensado.
6. Imprimir el diseño seleccionado de canales microfluídicos sobre papel Whatman número 1.
7. Diseñar e implementar un protocolo de un ensayo colorimétrico del sensor de papel empleando un lector colorimétrico experimental.

Introducción

Los metales pesados son constituyentes naturales del ambiente marino y de agua dulce. Generalmente se encuentran en concentraciones muy bajas, pero las actividades humanas tales como la industrial o minera han aumentado los niveles de iones metálicos en los sistemas de agua [1]. Son un grupo de elementos químicos que tienen una alta densidad, al menos 5 veces mayor que la del agua, y generalmente son tóxicos para los seres humanos. No son biodegradables y pueden acumularse en los ecosistemas. Dentro de ellos, también se incluyen ciertos metaloides, como el arsénico [2].

El arsénico es altamente venenoso incluso en concentraciones bajas. Disuelto en cuerpos de agua naturales, se encuentra en dos formas: 1) *Arsenato* [As^{5+}], dominante en aguas superficiales y 2) *arsenito* [As^{3+}], dominante en aguas subterráneas [3]. De ellos, el arsenito es el más tóxico para los sistemas biológicos [4]. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), el nivel estándar permitido de arsénico en el agua potable es de 10 ppb [5]. En particular, México está entre los países que se ven afectados por la contaminación por arsénico en aguas subterráneas [6]. Por ello, es importante desarrollar técnicas seguras y eficaces para la detección y cuantificación de niveles de arsénico. Ya se han desarrollado sistemas de sensado basados en espectroscopia de absorción atómica (AAS, *atomic absorption spectroscopy*), espectroscopia de fluorescencia atómica (AFS, *atomic fluorescence spectroscopy*) y plasma acoplado inductivamente con espectrometría de masas (ICP-MS, *inductively coupled plasma mass spectroscopy*) [7]. Todas estas técnicas cuentan con alta sensibilidad, especificidad, precisión, pero consumen mucho tiempo en la detección, son costosas, requieren mano de obra calificada y son más adecuadas para aplicaciones a nivel laboratorio [1].

La microfluídica es la ciencia de la mecánica de fluidos a microescala. Los sistemas a esta escala están compuestos por varios microcomponentes capaces de procesar y manipular con precisión volúmenes muy pequeños de fluidos. Es un campo de estudio interdisciplinario relativamente nuevo, pero ha tenido una evolución rápida. Sus principales categorías son: microfluídica de canales cerrados/confinados, microfluídica de canales abiertos y microfluídica de dos fases (gotas). En la microfluídica de canales abiertos se encuentran los dispositivos analíticos basados en papel (μPAD , *microfluidic paper-based analytical device*), que surgen como una necesidad de tener sistemas portátiles, fáciles de usar y de bajo costo. Sus aplicaciones incluyen el

diagnóstico médico, control de calidad de alimentos y monitoreo ambiental, entre otros [8].

Los μ PAD han tenido un rápido desarrollo en los últimos años dado que son generalmente rápidos, sensibles, selectivos, fáciles de usar, además de que no requieren de un tratamiento previo de las muestras de interés (analito). Otra de las ventajas es que aprovechan las fuerzas capilares y, por tanto, no requieren de componentes adicionales para el control del flujo, su costo es extremadamente bajo y su fabricación relativamente simple [9, 10]. Su aplicación en la detección de metales pesados es interesante porque proporcionan una plataforma de detección portátil, desechable, rápida y sensible, y aún más cuando se les combina con un sistema de lectura de bajo costo [9]. Algunos métodos de transducción incluyen los colorimétricos, fluorescentes, electroquímicos, electroquimioluminiscentes y basados en nanopartículas. La colorimetría es uno de los métodos más utilizados y suele estar combinado con la detección basada en nanopartículas metálicas ya que tienen un buen desempeño como indicadores reconocibles a simple vista [10].

Entre la variedad de nanopartículas metálicas que se utilizan para la detección colorimétrica de analitos de interés, las nanoestructuras anisotrópicas de oro pueden ser explotadas dado que presentan fuerte dispersión y absorción de la luz en el espectro visible, siendo factible la detección colorimétrica por mostrar mejor sensibilidad, mayor rango de detección y mayor resolución visual [7]. Específicamente, las nanovarillas de oro (AuNRs) son un tipo de nanoestructuras plasmónicas anisotrópicas que exhiben dos bandas de absorción de la luz en el espectro visible llamadas resonancia de plasmones superficiales localizados (LSPR, *localized surface plasmon resonance*). La primera es debida a la oscilación transversal de los electrones libres del metal en el eje corto y la otra debida a la oscilación longitudinal [11].

Se han realizado varios estudios sobre la detección de arsénico utilizando nanopartículas de oro, como el presentado por Priyadarshni y colaboradores [3], en el cual informan sobre un sensor colorimétrico basado en AuNPs funcionalizadas con ácido meso-2,3-dimercaptosuccínico (DMSA) (DMSA-AuNPs) para la detección de arsénico (III) y arsénico (V) en muestras de agua, con un límite de detección de aproximadamente 1 ppb. Domínguez-González y colaboradores [12] funcionalizaron AuNPs con GSH-DTT-CYs-PDCA, logrando un límite de detección de entre 2.5 y 8.4 ppb. Sahu y colaboradores [13] desarrollaron un sensor colorimétrico utilizando nanopartículas de oro funcionalizadas con glucosa, alcanzando un límite de detección de 5.6 ppb

El presente trabajo de investigación se enfocó en estudiar la respuesta colorimétrica de AuNRs bioconjugadas con queratina para la detección de concentraciones estándares de iones de As^{3+} en soluciones coloidales. La síntesis de AuNRs con diferentes razones de aspecto y bioconjugación

se realizó por ruta química, y su caracterización morfológica, razón de aspecto y de terminales reactivos fueron determinados por espectroscopias UV-Vis, fotoelectrónica de rayos X y microscopia electrónica de transmisión. Así mismo, se diseñó y fabricó un dispositivo portátil de papel con zonas de inyectado, control negativo, control positivo y de sensado. Finalmente, se demostró la viabilidad del uso de papel Whatman número 1, para diferenciar la respuesta colorimétrica de diversas concentraciones de colorante natural, empleando un dispositivo experimental de lectura colorimétrica desarrollado en nuestro grupo de trabajo.

En el capítulo 1 se abordan los antecedentes relativos a la toxicidad de iones metálicos, así como los métodos de detección, incluyendo los dispositivos microfluídicos basados en papel (μ PAD) y sus métodos de transducción, incluyendo la colorimetría. Así mismo, se incluye la descripción de algunas técnicas de fabricación y caracterización de nanopartículas de oro, particularmente las empleadas en este trabajo de tesis.

En el capítulo 2 se describe la metodología y desarrollo experimental, que incluyen los reactivos y equipos, protocolos de síntesis y bioconjugación y sensado coloidal a concentraciones de arsenito, condiciones de caracterización de las técnicas empleadas, así como las condiciones de fabricación de μ PADs y prueba de concepto empleando un lector colorimétrico experimental sobre papel Whatman número 1.

Por su parte en el capítulo 3 se presentan y discuten los resultados experimentales de los componentes para la fabricación de un sensor microfluídico de papel con nanovarillas de oro bioconjugadas para la detección colorimétrica de iones As^{3+} .

Nomenclatura y Abreviaturas

μPAD	Dispositivo microfluídico de papel
AuNRs	Nanorods o nanovarillas de oro
UV-Vis	Ultravioleta-Visible
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
HAuCl₄·3H₂O	Ácido tetracloroáurico tri hidratado
AgNO₃	Nitrato de plata
NaBH₄	Borohidruro de sodio
Agua DI	Agua desionizada
Ker	Queratina
AuNRs-Ker	Nanorods de oro funcionalizados con queratina
RCF	Fuerza centrífuga relativa
PDMS	Polidimetilsiloxano
GSH	Glutación
DTT	DL-Dithiothreitol
CYs	L-cisteína
PDCA	Ácido dipicolínico
CMYK	Cian, Magenta, Amarillo y Negro
FWHM	Anchura a media altura de un determinado pico.

Índice General

Agradecimientos	ii
<i>Dedicatorias</i>	iii
Resumen	iv
Introducción	vi
Nomenclatura y Abreviaturas	viii
Índice de Tablas	xi
Índice de Figuras	xii
Capítulo 1	1
Capítulo 2	13
Capítulo 3	28
Conclusiones	56
Referencias	66

Índice de Tablas

Tabla 2.1. Resumen de experimentos.	36
Tabla 3.1. Resumen de experimentos, donde X corresponde a la concentración de As^{3+} empleada (0, 2, 4, 6, 8, 10 y 50 $\mu\text{g/mL}$).	47
Tabla 3.2. Máximo de resonancia LSPR longitudinal para los experimentos M111, después de la agregación de iones de As^{3+}	49
Tabla 3.3. Máximo de resonancia LSPR longitudinal para los experimentos M221, después de la agregación de iones de As^{3+}	51
Tabla 3.4. Razón de área bajo la curva de las absorbancias en las bandas LSPR para los experimentos M111 y M221, después de la agregación de iones de As^{3+}	51
Tabla 3.5. Ancho a altura media (FWHM) y factor de calidad Q para las muestras M111_X. Se incluye la muestra AuNRs	52
Tabla 3.6. Ancho a altura media (FWHM) y factor de calidad Q para las muestras M221_X.....	52
Tabla 3.7. Concentración atómica de los elementos: carbono, nitrógeno, oxígeno, azufre, oro y arsénico en las muestras.....	56
Tabla 3.8. Código de colores para la impresión de μPADs en códigos RGB y CMYK.....	63
Tabla 3.9. Variación de parámetros en el primer experimento antes y después del tratamiento térmico.	64
Tabla 3.10. Variación de parámetros en el primer experimento antes y después del tratamiento térmico.	65
Tabla 3.11. Valores RGB obtenidos con el dispositivo de lectura colorimétrica experimental.	67

Índice de Figuras

Figura 1.1. Enfoque <i>top-down</i> y <i>bottom-up</i> para la síntesis de nanopartículas.	15
Figura 1.2. Luz incidente y transmitida a través de la celda de muestra en un experimento UV-Vis.	22
Figura 1.3. Esquema de un espectrofotómetro convencional.	23
Figura 1.4. Esquema del principio de la espectroscopia de fotoelectrones de rayos X.	24
Figura 1.5. Partes de un microscopio electrónico de transmisión.	25
Figura 2.1. Espectrofotómetro Nanodrop One C.	28
Figura 2.2. Estructura de la queratina.	30
Figura 2.3. Estructura representativa de la queratina.	31
Figura 2.4. Liofilizadora FreeZone Labconco.	32
Figura 2.5. Obtención y purificación de queratina (Ker). a) Arreglo experimental, b) disolución de Ker, c) hidratación de BIm+Cl ⁻ , d) filtración de complejo BIm+Cl ⁻ /Ker, e) destilación de BIm+Cl ⁻ para su recuperación, f) liofilizado de queratina purificada.	34
Figura 2.6. Proceso de la bioconjugación de los AuNRs con la queratina.	35
Figura 2.7. Impresora ColorQube 8580.	38
Figura 2.8. Diagrama experimental de la fabricación de los μ PAD.	39
Figura 2.9. a) Carcasa del dispositivo y b) Pruebas de funcionamiento en protoboard del dispositivo de lectura colorimétrica.	40
Figura 3.1. a) Solución semilla utilizada en la síntesis de AuNRs y b) Nanorods de oro.	42
Figura 3.2. Disolución de queratina.	42
Figura 3.3. Micrografías TEM de AuNRs, en diferentes ampliaciones.	43
Figura 3.4. Histograma de la distribución de la razón de aspecto de los AuNRs no modificados, obtenidas mediante las micrografías TEM.	44
Figura 3.5. Micrografías de TEM de AuNRs bioconjugados con queratina, en diferentes ampliaciones.	44
Figura 3.6. Histograma de la distribución de la razón de aspecto de los AuNRs bioconjugados con queratina obtenidas mediante las imágenes de TEM.	45
Figura 3.7. Micrografías de TEM de AuNRs bioconjugados con queratina y en interacción con As ³⁺	45
Figura 3.8. Histograma de la distribución de la razón de aspecto de los AuNRs bioconjugados con queratina y en interacción con As ³⁺ obtenidas mediante las imágenes de TEM.	46
Figura 3.9. Espectros de absorbancia de semillas de oro y AuNRs.	47
Figura 3.10. Coloides de AuNRs-Ker del experimento M111, después de la agregación de iones de As ³⁺	48

Figura 3.11. Espectros de absorbancia para los coloides bioconjugados AuNRs-Ker con el analito arsenito As^{3+} para las muestras M111_X.....	49
Figura 3.12. Coloides de AuNRs-Ker del experimento M221 a) antes y b) después de la agregación de iones de As^{3+}	50
Figura 3.13. Espectros de absorbancia para los coloides bioconjugados AuNRs-Ker con el analito arsenito As^{3+} para las muestras M221_X.....	50
Figura 3.14. Factor Q de las muestras M111_X.....	53
Figura 3.15. Factor Q de las muestras M221_X.....	53
Figura 3.16. Espectro de barrido amplio de XPS.....	55
Figura 3.17. Espectros de XPS de alta resolución de C(1s).....	57
Figura 3.18. Espectros de XPS de alta resolución de O(1s).....	58
Figura 3.19. Espectros de XPS de alta resolución de Au(4f).....	59
Figura 3.20. Espectros de XPS de alta resolución de S(2p).....	59
Figura 3.21. Espectros de XPS de alta resolución de As(3d).....	60
Figura 3.22. Micrografías SEM de papel Whatman No. 1, empleado en la fabricación de los μ PADs, en diferentes ampliaciones. Espesor papel 180 μ m, peso base 87 g/m^3	60
Figura 3.23. Determinación de los diámetros de los poros y fibras.....	61
Figura 3.24. a) Histograma de frecuencias de la distribución del diámetro de las fibras del papel Whatman 1. b) Histograma de frecuencias de la distribución del diámetro promedio de los poros del papel Whatman 1.....	61
Figura 3.25. Diseño del μ PAD con 6 canales radiales, zona de inyección (ZI) en el centro y 6 zonas de sensado (ZS) en los extremos.....	62
Figura 3.26. μ PADs con ancho de canal de 3 mm, diámetro en zona de la zona de sensado de 6 mm, diámetro de la zona de inyección de 12 mm y longitud de canal de 14.5 mm. a) impresiones en cuatro colores, b) μ PADs después de tratamiento térmico a $T = 166$ °C.....	64
Figura 3.27. μ PADs con diámetro de ZS de 6mm, diámetro de ZI de 12 mm y longitud de canal de a)7 mm y b) 4.8 mm, después de tratamiento térmico a $T = 166$ °C.....	65
Figura 3.28. Réplicas y prueba de inyección de μ PADs en un solo color de cera.....	66
Figura 3.29. Pruebas de inyección de agua/colorante a distintas relaciones: C1 (10%), C2 (20%), C3 (40%) y C4 (50%).....	66
Figura 3.30. Valores RGB para cada muestra: C1 (10%), C2 (20%), C3 (40%) y C4 (50%).....	67

Capítulo 1

Antecedentes

En este capítulo se presenta la revisión de conceptos básicos e históricos en nanotecnología, métodos de síntesis de nanoestructuras, la evaluación de la toxicidad de iones de metales pesados en agua dulce, con un enfoque particular en el arsénico, y se exploran diversos métodos de detección. Entre estos métodos, se destaca la utilización de dispositivos microfluídicos basados en papel (μ PAD), donde la colorimetría desempeña un papel crucial y suele combinarse con la detección basada en nanopartículas. Esta combinación de técnicas se presenta como una herramienta eficaz y de bajo costo para la detección de arsénico y otros contaminantes en agua.

1.1 Historia de la nanotecnología

La historia precisa de la nanotecnología aún es desconocida, y aunque Richard Feynman se le considera el pionero en este campo debido a su icónica conferencia de 1959, es importante destacar que ya existían aplicaciones de nanomateriales antes de su contribución. Por ejemplo, en 1449 John Utynam patentó un vidrio basado en nanopartículas de oro, marcando uno de los primeros usos documentados de nanotecnología en la historia [14]. En el siglo XVI, Paracelso utilizó nanopartículas de oro para tratar a pacientes que padecían de distintas enfermedades, adelantándose a su época en el uso terapéutico de nanoestructuras [15].

El concepto de nanómetro, $1 \text{ nm} = 1 \times 10^{-9} \text{ m}$, fue introducido por Richard Zsigmondy, quien recibió el Premio Nobel de Química en 1925 por su destacada labor en la medición del tamaño de partículas coloidales de oro, utilizando un microscopio. Si bien Feynman no fue el primero en introducir el término "nanotecnología", su conferencia "*There is plenty of room at the bottom*" ayudó a catalizar el desarrollo del campo al plantear la posibilidad de manipular la materia a escalas nanométricas.

En 1974, Norio Taniguchi acuñó el término "nanotecnología" para describir los mecanismos de procesamiento de materiales a escala nanométrica [16]. La invención del microscopio de exploración por efecto túnel (STM, *scanning tunneling microscope*) y el posterior descubrimiento de los fulerenos y los nanotubos de carbono, impulsaron aún más la investigación en nanotecnología al proporcionar herramientas para visualizar y manipular átomos y moléculas a nivel nanométrico.

En Estados Unidos de América, se impulsaron iniciativas en 1991 y 2001 para crear conciencia sobre las aplicaciones potenciales de la nanotecnología, donde el Grupo de Trabajo Interinstitucional sobre Nanociencia, Ingeniería y Tecnología (IWGN, *International working group on nanoscience, engineering, and technology*) pronosticó la investigación en nanotecnología para los siguientes 10 años. Estas contribuciones han abierto nuevas áreas de investigación y han demostrado el potencial transformador de la nanotecnología en una variedad

de campos como la electrónica, medicina, materiales, medio ambiente, entre otros [17].

Desde entonces, diversos hitos históricos en este campo demuestran su relevancia en múltiples campos. El reconocimiento temprano de las propiedades únicas de las nanoestructuras y el desarrollo de aplicaciones pioneras han brindado una base sólida para explorar aún más el mundo a escala nanométrica, incluyendo el desarrollo y aplicación de nuevos métodos de fabricación, funcionalización y caracterización de sus diversas propiedades fisicoquímicas.

1.2 Métodos de síntesis de nanoestructuras

La variedad de métodos disponibles para la síntesis de nanoestructuras es amplia y diversa, abarcando enfoques físicos, químicos y biológicos. Estos métodos no solo permiten sintetizar nanoestructuras, sino que también ofrecen una plataforma para explorar sus propiedades fisicoquímicas y aplicaciones en una amplia gama de campos. Se llevan a cabo a través de diversos enfoques, siendo los más comunes el enfoque de arriba hacia abajo (*top-down*) y el enfoque de abajo hacia arriba (*bottom-up*). El método *top-down* comienza con una masa sólida y la convierte en partículas nanométricas mediante la aplicación de algún método mecánico y posteriormente se estabilizan las partículas al tamaño requerido. Mientras, el enfoque *bottom-up* implica la construcción de nanoestructuras a partir de componentes más pequeños, como átomos, moléculas o clústeres, mediante la aplicación de métodos químicos [18]. La **Figura 1.1** muestra los diferentes enfoques para la síntesis de nanoestructuras.

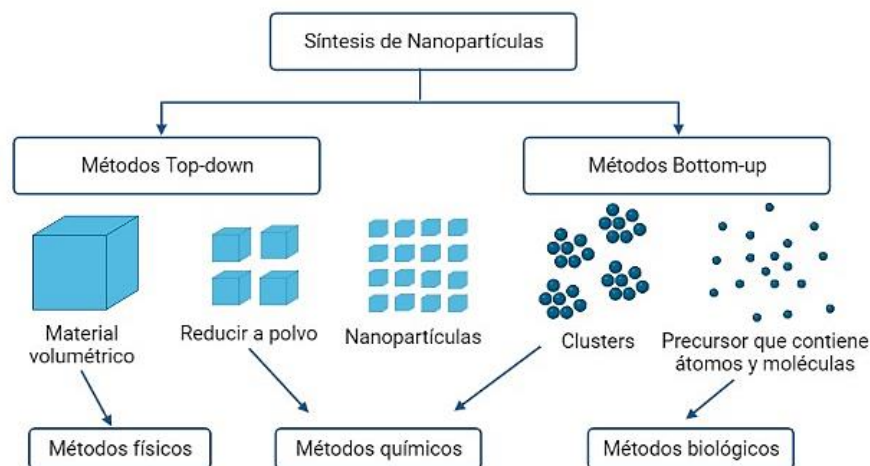


Figura 1.1. Enfoque *top-down* y *bottom-up* para la síntesis de nanopartículas.

Entre los métodos físicos se encuentran el método de descarga de arco, litografía de haz de electrones, molienda mecánica y *spray* pirólisis. Por su parte, entre los métodos químicos se incluyen al método de coprecipitación, método electroquímico, reducción química de sales metálicas, método de microemulsión y proceso sol-gel. Finalmente, entre los métodos biológicos

se encuentran la utilización de plantas y sus extractos, microorganismos, algas y enzimas y biomoléculas.

Esta diversidad de métodos y enfoques nos permite crear y explorar una amplia gama de nanoestructuras, cada una con propiedades únicas y potenciales aplicaciones, derivadas de su dimensionalidad, composición, estructura, entre otras características.

1.2.1 Clasificación de nanoestructuras

La clasificación de las nanoestructuras, según su dimensionalidad, es de gran importancia en el campo de la nanotecnología, ya que permite una comprensión más profunda de las propiedades fisicoquímicas y comportamientos de los materiales a escala nanométrica. Esta clasificación se basa en el número de dimensiones donde se presenta la escala nanométrica en una nanoestructura, incluyendo dimensionalidad cero (0D), uno (1D), dos (2D) y tres (3D). En este trabajo se fabricaron nanoestructuras unidimensionales.

Materiales nanoestructurados de dimensionalidad cero (0D)

Los materiales nanoestructurados de dimensionalidad cero son aquellos en los que todas las dimensiones son inferiores a 100 nm. Algunos de estos materiales incluyen arreglos de partículas homogéneas y arreglos de partículas heterogéneas, como puntos cuánticos (QDs, *quantum dots*), esferas huecas, QDs de núcleo-coraza, entre otros [19].

Materiales nanoestructurados de dimensionalidad uno (1D)

Las nanoestructuras unidimensionales (1D) se definen como materiales con una dimensión mayor a 100 nm mientras que las otras están a escala nanométrica. Se han utilizado en diversos campos debido a sus propiedades superiores en comparación con los materiales o estructuras en bulto. Los nanocables, nanobarras y nanotubos son ejemplos de este tipo de nanoestructuras [19].

Materiales nanoestructurados de dimensionalidad dos (2D)

En las nanoestructuras bidimensionales (2D), dos dimensiones están en la microescala y una dimensión en la nanoescala. Las películas ultradelgadas y las nanocapas son ejemplos de nanoestructuras 2D. Usualmente se sintetizan depositándolos sobre un sustrato en forma de una capa única o multicapa. Pueden ser amorfos o cristalinos, metálicos o no metálicos, o incluso tener una naturaleza polimérica [19].

Materiales nanoestructurados de dimensionalidad tres (3D)

Las nanoestructuras tridimensionales (3D) se constituyen de nanomateriales 0D, 1D o 2D, aunque

su mezcla sea un material de dimensiones superiores a los 100 nm. Ejemplos de ellas son las micelas decoradas con nanopartículas o nanopartículas embebidas dentro de nanofibras [19].

Como se ha mencionado, diversas propiedades físico-químicas de los materiales en bulto, se ven modificadas cuando disminuye su tamaño a nivel nanométrico. Particularmente, sus propiedades superficiales como adhesión y relación área/volumen, son explotadas cuando las nanoestructuras se aplican a la detección y/o recuperación de metales pesados. En este trabajo, se fabricaron novarillas de oro (AuNRs) bioconjugadas para la detección de arsénico en soluciones coloidales.

1.3 Metales pesados: Arsénico

En la actualidad, uno de los principales problemas medioambientales es la contaminación por metales pesados en los cuerpos de agua dulce, particularmente destinados a riego o consumo humano. Los metales pesados (MP) son compuestos que se caracterizan por ser persistentes y no biodegradables, por ello la importancia de su eliminación.

Entre este grupo de elementos se encuentra el arsénico. El arsénico es un elemento con el símbolo químico As, número atómico Z de 33 y masa atómica de 74.9. Se clasifica en el medio del grupo 15 de la tabla periódica y por ser un metaloide natural que se encuentra en muchos minerales de la corteza terrestre, presenta propiedades tanto de metal como de no metal. Su liberación a la atmósfera proviene tanto de fuentes naturales como antropogénicas [20]. Se encuentra en formas inorgánicas y orgánicas, así como en diferentes estados de oxidación o valencia. Los estados de oxidación del arsénico incluyen -III, 0, III y V. Ejemplos de arsenicales en estos estados son arsina, arsénico elemental, arsenito y arsenato, respectivamente. La arsina es un gas incoloro, inodoro y altamente tóxico. La forma y el estado de valencia del arsénico son importantes en sus posibles efectos tóxicos. En términos generales los arsenicales inorgánicos son más tóxicos que los arsenicales orgánicos; los arsenicales trivalentes (III) como el arsenito son más tóxicos que los arsenicales pentavalentes (V) como el arseniato, mientras que los arsenicales orgánicos trivalentes son igual o más tóxicos que los arsenicales inorgánicos trivalentes [21].

La contaminación por arsénico en suministros de agua ha sido encontrada en muchos países, incluyendo Argentina, Bangladesh, Camboya, Canadá, Chile, China, Ghana, Hungría, India, Laos, Mongolia, Nepal, Pakistán, Polonia, Taiwán, Tailandia, Reino Unido, Estados Unidos, Vietnam y México. Incluso en países desarrollados, cerca del 10% de los recursos de agua subterránea exceden los niveles seguros de arsénico para consumo humano.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció como límite una concentración de 10 µg/L (10 ppb) de arsénico en el agua potable, en 1993, debido a la evidencia de que el arsénico

inorgánico es un carcinógeno humano. Estados Unidos adoptó este estándar en 2006. Sin embargo, en Bangladesh, el nivel máximo de contaminación permitido es de 50 µg/L, lo que expone a una población cercana a los 100 millones de personas a niveles peligrosos de arsénico.

La contaminación del agua subterránea con arsénico puede tener múltiples fuentes, como pesticidas, conservantes de madera, fabricación de vidrio y otros usos del arsénico. A menudo, la contaminación natural por arsénico en el suelo es difícil de controlar. El caso más grave se encuentra en Bangladesh, donde se descubrió que muchos pozos tubulares poco profundos instalados en la década de 1970 estaban contaminados con arsénico, ya en la década de 1980. Se estima que hasta 100 millones de sus habitantes estuvieron expuestos a niveles elevados de este contaminante, superando los niveles establecidos por la OMS.

Es importante tener en cuenta que las pautas de la OMS no consideran las diferentes especies de arsénico, a pesar de que se sabe que la toxicidad varía dependiendo de su forma química. Los síntomas de la exposición crónica al arsénico pueden tardar meses o incluso años en aparecer y pueden incluir manchas oscuras en la piel, agrandamiento de órganos como el hígado, riñones y bazo, así como el desarrollo de enfermedades como nefropatía, hepatopatía y varios tipos de cáncer [22].

En resumen, la presencia de metales pesados en fuentes de agua, entre ellos el arsénico, es un problema global que amenaza tanto a países en desarrollo como a naciones desarrolladas, representando un riesgo significativo para la salud humana y el medio ambiente. Dada la gravedad de su presencia, es fundamental que se exploren enfoques innovadores para la detección y remediación de la contaminación por metales pesados. En este contexto, la microfluídica en papel emerge como una prometedora tecnología que puede desempeñar un rol crucial en la monitorización de esta contaminación, particularmente por arsénico.

1.4 Microfluídica basada en papel

La microfluídica basada en papel (µPADs), también conocida como "*lab on paper*" o "*dispositivos analíticos basados en papel*", es un campo emergente de la microfluídica que utiliza papel como sustrato para la fabricación de canales y dispositivos microfluídicos. Esta técnica ofrece numerosas ventajas, entre las que se incluyen su bajo costo, portabilidad y facilidad de fabricación. Ha encontrado aplicaciones en diversos campos, como la atención médica, el monitoreo ambiental, la seguridad alimentaria y el análisis forense, entre otros.

El principio fundamental detrás de la microfluídica basada en papel radica en la creación de dos regiones distintas en el sustrato de papel: las áreas hidrofílicas, que permiten el flujo de líquidos, y las áreas hidrofóbicas, que actúan como barreras físicas. Presentan varias ventajas sobre sus

contrapartes basadas en el polímero PDMS (polidimetilsiloxano), puesto que *aprovecha las fuerzas capilares para controlar el flujo de líquidos*, eliminando la necesidad de componentes adicionales como bombas de inyección. Otro aspecto clave es el *bajo costo* asociado con la microfluídica basada en papel. En comparación con sustratos microfluídicos tradicionales, como el vidrio y el silicio, el papel es considerablemente más económico dado que su impresión se puede llevar a cabo utilizando técnicas de impresión de bajo costo, como la impresión por chorro de tinta, la serigrafía y la impresión con cera [23]. La *portabilidad* es otra ventaja destacada de la microfluídica basada en papel. Los dispositivos microfluídicos basados en papel son ligeros y compactos, lo que los convierte en herramientas ideales para diagnósticos en el punto de atención y pruebas en campo. Por ejemplo, se han utilizado para la detección de enfermedades como la malaria y el virus del sida (VIH) en regiones remotas y con recursos limitados. Esto permite llevar a cabo pruebas de diagnóstico sin depender de costosos equipos de laboratorio. Además, la microfluídica basada en papel ofrece la *flexibilidad de diseño* de canales microfluídicos, que pueden tomar diversas formas y tamaños para adaptarse a diferentes aplicaciones. La superficie del papel puede ser modificada químicamente para cambiar sus propiedades hidrofóbicas o hidrofílicas, lo que permite controlar el flujo de líquidos a través de los canales [24]. Una ventaja adicional es la capacidad de realizar *múltiples análisis en un solo dispositivo*. El papel es un material poroso que puede retener diferentes reactivos, lo que posibilita llevar a cabo múltiples pruebas en una sola muestra. Esto resulta especialmente útil para el análisis de muestras limitadas y para la realización de pruebas multiplexadas en una única muestra. Entonces, la microfluídica basada en papel se erige como una tecnología prometedora debido a su bajo costo, portabilidad, facilidad de fabricación y versatilidad de diseño. Se ha aplicado con éxito en una variedad de campos, desde la atención médica hasta el monitoreo ambiental y la seguridad alimentaria.

1.5 Métodos de detección de metales pesados

La detección y cuantificación de metales pesados es fundamental debido a sus efectos perjudiciales en el medio ambiente y la salud pública. A lo largo de los años, se han desarrollado diversos métodos de detección empleados combinadamente con microfluídica basada en papel. Entre ellos la detección colorimétrica, fluorescente, electroquímica, quimioluminiscente, electroquimioluminiscente y basada en nanopartículas.

1.5.1 Detección Colorimétrica

La detección colorimétrica es uno de los métodos más ampliamente utilizados en el análisis de laboratorio y aplicaciones industriales para la identificación de metales pesados. Proporciona

lecturas semicuantitativas con la ayuda de una gráfica de calibración, creando zonas de detección en papel para la detección simultánea de diferentes analitos. Después de cargar la muestra y distribuirla en diferentes zonas de reacción, se producen reacciones químicas entre los reactivos y los analitos objetivo que permiten la determinación visual de los analitos objetivo a través de los cambios de color en las zonas de reacción [25].

1.5.2 Detección fluorescente

La detección fluorescente se emplea para reconocer analitos objetivo, como los iones de metales pesados, aplicando agentes quelantes como receptores, los cuales interactúan eficazmente con los analitos. Las unidades quelantes se conectan con unidades fluoróforas para generar fluorescencia reconocible, ya sea aumentando o disminuyendo su intensidad [25].

1.5.3 Detección electroquímica

Las técnicas electroquímicas tradicionales generalmente involucran un sistema de tres electrodos, un electrodo de trabajo, un electrodo contador y un electrodo de referencia. Técnicamente hablando, con solo dos electrodos, aún se puede llevar a cabo una medición. Sin embargo, a medida que la concentración de analitos disminuye debido a la reacción química, ocurre una caída de potencial en el electrodo de trabajo, lo que deteriora el rendimiento del sensor. Por lo tanto, se puede incorporar un electrodo de referencia con un potencial estable para ajustar el potencial del electrodo de trabajo.

1.5.4 Detección quimioluminiscente y electroquimioluminiscente

En comparación con las técnicas fluorescentes, una técnica quimioluminiscente es similar, con la diferencia de que la luz se genera mediante reacciones químicas de dos reactivos bajo la influencia de un catalizador o intermediarios excitados, en lugar de fluorescencia. En el proceso de quimioluminiscencia existen dos mecanismos diferentes: uno en el que las especies emisoras se generan directamente por la oxidación de los reactivos, mientras que el otro implica la mejora o inhibición de los efectos de los compuestos luminiscentes. Sin embargo, la quimioluminiscencia de las moléculas inorgánicas es muy débil, y se han desarrollado varios métodos de mejora. Similarmente, una técnica electroquimioluminiscente depende de la luminiscencia producida por reacciones electroquímicas. Técnicamente hablando, la luz emitida se genera en función de las reacciones de transferencia de electrones, que ocurren entre los radicales catiónicos y aniónicos electrogenerados. A través de estas reacciones de transferencia de electrones, se forman estados excitados de intermediarios y, como resultado, se emite luz [25].

1.5.5 Detección basada en nanopartículas

Debido a su buena eficacia como indicador reconocible a simple vista, la detección basada en nanopartículas (por ejemplo, nanopartículas de oro o de plata), generalmente no requiere de lectores adicionales para detecciones cualitativas. Además, las nanopartículas tienen una buena afinidad por los analitos objetivo (por ejemplo, iones de metales pesados), para la formación de conjugados.

En este trabajo de tesis, para la fabricación de los componentes de μ PADs capaces de detectar arsénico, se empleó una combinación del método colorimétrico con nanopartículas. Este enfoque aprovecha las ventajas tanto de la detección colorimétrica, que permite una fácil interpretación visual de los resultados, como de las nanopartículas, que mejoran la sensibilidad y la selectividad de la detección. En nuestro método, se bioconjugaron AuNRs con queratina tal que reaccionen de manera específica a arsénico. De esta forma, en presencia de arsénico, se producirá un cambio de color característico de la solución coloidal y por ende eventualmente en el μ PAD. Se espera que este cambio de color sea claramente visible y permita una detección rápida y confiable del arsénico, empleando un dispositivo de lectura de color RGB. Además de su eficacia, esta combinación de métodos también ofrecería la ventaja de ser adecuada para detecciones cualitativas y semicuantitativas, lo que es especialmente valioso en situaciones donde se necesita una evaluación rápida y accesible de la presencia de arsénico.

1.6 Técnicas de caracterización

En este trabajo de tesis se emplearon microscopia de electrónica de transmisión y espectroscopia ultravioleta visible para la determinación de la morfología y de las bandas plasmónicas de las nanovarillas de oro fabricadas, mientras que la espectroscopia ultravioleta visible y de fotoelectrones de rayos X fueron empleadas para la determinación de la concentración de arsénico en soluciones coloidales de las nanovarillas bioconjugadas con queratina.

1.6.1 Espectroscopia ultravioleta visible (UV-Vis)

La espectroscopia UV-Visible es una técnica de caracterización ampliamente utilizada en diversos campos, como la química, la bioquímica y la ciencia de materiales, dado que es rápida, precisa relativamente no destructiva y requiere una pequeña cantidad de muestra (2 μ L). Permite el análisis cualitativo y cuantitativo (concentración y propiedades químicas) de una amplia gama de compuestos a través del análisis de las transiciones electrónicas que ocurren en las regiones ultravioleta (UV) y visible del espectro electromagnético (300 a 900 nm) Su principio fundamental

implica medir la absorbancia o transmitancia de una muestra cuando es irradiada con luz de diferentes longitudes de onda en el ultravioleta visible. Dado que la absorbancia es directamente proporcional a la concentración de la muestra, permite su cuantificación [26]. Cuando una muestra es expuesta a luz, la energía de los fotones puede ser absorbida por las moléculas en la muestra, promoviendo a los electrones a niveles de energía más altos. La energía absorbida es igual a la diferencia entre los niveles de energía del electrón antes y después de la transición donde la longitud de onda de la luz absorbida está relacionada con la diferencia de energía dada por

$$E = h\nu = hc/\lambda \quad (1.1)$$

donde E es la energía del fotón, h es la constante de Planck, ν la frecuencia de la radiación, c la velocidad de la luz y λ la longitud de onda de la radiación [27].

En la región UV, las transiciones implican la excitación de electrones desde el estado fundamental a estados excitados o a una diferente configuración electrónica. Estas transiciones están asociadas con la presencia de metales de transición y sus complejos, así como ciertos compuestos orgánicos con dobles enlaces conjugados (dobles enlaces, grupos carbonilo y anillos aromáticos) [28].

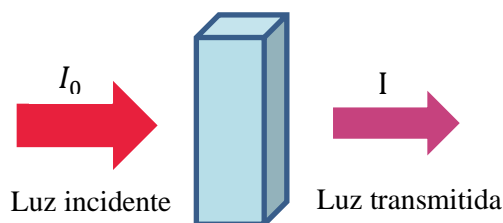


Figura 1.2. Luz incidente y transmitida a través de la celda de muestra en un experimento UV-Vis.

Para cada longitud de onda de luz que pasa a través del espectrofotómetro, se mide la intensidad de la luz que pasa a través de la celda de la muestra. A esta cantidad se le denomina luz incidente I_0 y a la cantidad de luz que atraviesa la celda de muestra y emerge por el otro lado se le llama luz transmitida I (**Figura 1.2**).

Los componentes básicos de un espectrofotómetro UV-Vis (**Figura 1.**) son [26]:

- Una fuente que genera una banda ancha de radiación electromagnética.
- Un dispositivo de dispersión que selecciona una longitud de onda particular de la radiación de la fuente.
- Un área de muestra.
- Uno o más detectores para medir la intensidad de la radiación.
- Otros componentes ópticos, como lentes ópticos o espejos, transmiten la luz a través del instrumento.

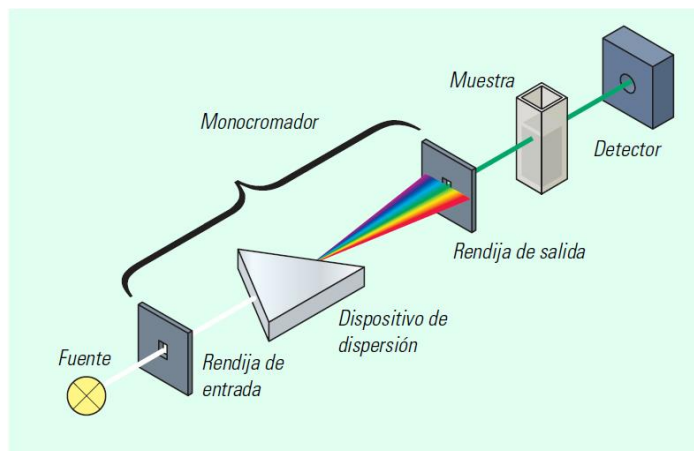


Figura 1.3. Esquema de un espectrofotómetro convencional. Tomada de [26].

1.6.2 Espectroscopia de fotoelectrones de rayos X (XPS)

La espectroscopia de fotoelectrones de rayos X (XPS, *X-ray photoelectron spectroscopy*) es una técnica de caracterización de materiales que proporciona información de los primeros 10 nm de la superficie. XPS brinda información de todos los elementos, excluyendo hidrógeno y helio, en concentraciones superiores al 0.1% atómico, con una sensibilidad de detección que oscila entre el 0.1% y el 1% atómico [29]. Su base teórica es el efecto fotoeléctrico. La fotoemisión se basa en la irradiación de una muestra con fotones con una energía superior a la energía de ligadura de los electrones de los átomos. Esto hace que los electrones salgan de la muestra con una energía cinética igual a la diferencia de la energía del fotón y la energía de ligadura. Sin embargo, experimentalmente,

$$K = h\nu - EL - \Phi_{\text{espec}} \quad (1.2)$$

donde $h = 6.62 \times 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$ y ν es la frecuencia de la radiación (en Hz), EL es la energía de ligadura, K la energía cinética medida con el analizador del espectrómetro y Φ_{espec} la función de trabajo del espectrómetro [30].

La información que aporta XPS incluye:

- La identificación de todos los elementos (excepto H y He) presentes en la muestra con concentraciones $> 0.1 \%$ atómico.
- Determinación semicuantitativa de la composición superficial elemental aproximada (error $< \pm 10\%$).
- Detalles sobre el entorno molecular (estado de oxidación, átomos vecinos, etc.).
- Identificación de los grupos orgánicos que se usan reacciones de derivatización.
- Análisis elemental no destructivo hasta profundidades de 10 nm de la muestra y estudio de heterogeneidad en la superficie.

- Análisis elemental destructivo hasta profundidades de cientos de nanómetros de la muestra usando erosión controlada con iones.
- Variaciones laterales en la composición superficial (resoluciones espaciales hasta 5 μm para los instrumentos de laboratorio y resoluciones espaciales hasta 40 nanómetros para los instrumentos que emplean radiación sincrotrón).
- Identificación de materiales mediante “Huella Dactilar” usando espectros de la banda de la Valencia y de la identificación de los orbitales de enlace.
- Estudios en superficies hidratadas (congeladas) [31].

Los principales componentes de un instrumento XPS, incluyen (**Figura 1.4**) [30]:

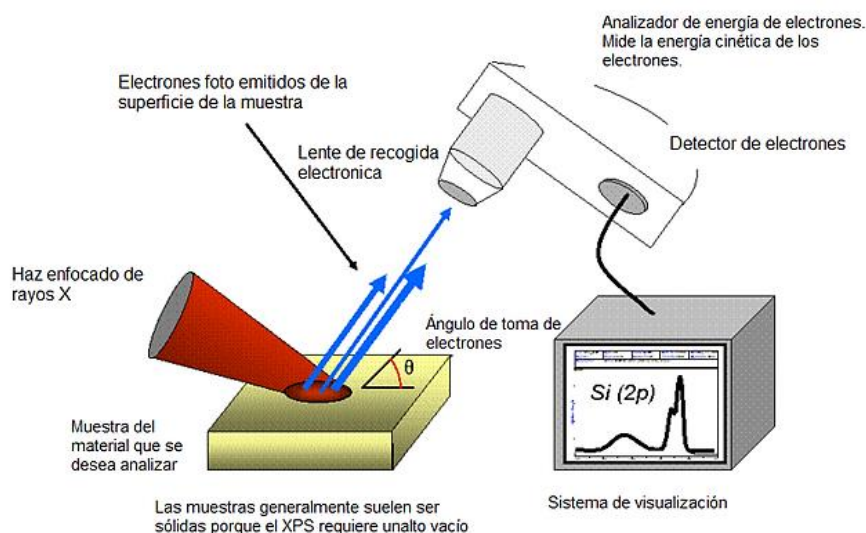


Figura 1.4. Esquema del principio de la espectroscopia de fotoelectrones de rayos X. Tomada de [32].

- Un brazo inyector de muestras, que tiene la función de cargar e introducir la muestra en la cámara de análisis.
- Una precámara de vacío y estación de estacionamiento de muestra para mantener múltiples porta muestras bajo condiciones controladas de vacío.
- Un analizador de electrones que filtra los electrones por energía.
- Un detector de electrones para medir las señales emitidas desde el analizador.
- Una fuente de rayos X, normalmente se utilizan rayos X de Al $K\alpha$ para excitar la muestra. Se utiliza un monocromador para permitir que solo los rayos X de esta energía incidan sobre la muestra.
- Un spot focalizado para análisis de alta resolución en áreas discretas de las muestras.
- Una fuente de rayos X no monocromática que ilumina toda la superficie de la muestra para análisis cuantitativos en materiales heterogéneos.
- Un cañón de iones para limpieza y perfiles de profundidad de muestras.

- Un sistema óptico de visualización para observar la imagen de la superficie de la muestra.
- Una cámara de ultra vacío que alberga todo el sistema.

1.6.3 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

La microscopía electrónica de transmisión (TEM, *transmission electron microscopy*) es una técnica de imágenes que utiliza un haz de electrones altamente energéticos para observar muestras en detalle con una resolución inclusive atómica. El haz de electrones se dirige a través de una muestra de unos pocos nanómetros de espesor, tal que permiten el paso de los electrones, presentándose dispersiones elástica e inelástica [33]. Una parte de los electrones rebotan o son absorbidos por el objeto y otros lo atraviesan formando una imagen aumentada de la muestra. La información recopilada se emplea para generar imágenes detalladas de la estructura de la muestra. Adicionalmente, se puede obtener información sobre la estructura cristalina, la morfología, la composición química y otras propiedades de la muestra. Es una herramienta destructiva de uso en caracterización de materiales en campos como ciencia de materiales, nanotecnología, biología, metalurgia, entre otras disciplinas.

Las partes principales de un microscopio electrónico de transmisión (**Figura 1.5**) son:

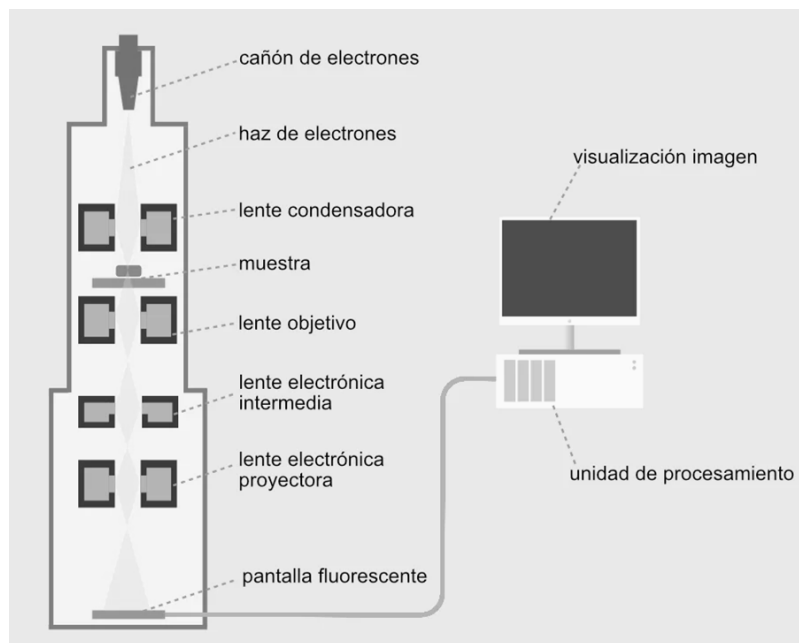


Figura 1.5. Partes de un microscopio electrónico de transmisión Tomada de [34].

- Cañón de electrones, que emite los electrones que chocan o atraviesan la muestra, creando una imagen aumentada.
- Lentes electromagnéticas condensadoras, para crear campos magnéticos que dirigen y enfocan el haz de electrones.
- Sistema de alto vacío, que evita la desviación de los electrones en su trayecto a la muestra.

- Portaobjetos, donde se sitúa la muestra después de su preparación.
- Placa fotográfica o pantalla fluorescente, que se coloca detrás del objeto a visualizar para registrar la imagen aumentada.
- Sistema de registro que muestra la imagen que producen los electrones.

Capítulo 2

Desarrollo Experimental

En este capítulo se describe la metodología aplicada en la realización del presente trabajo de tesis. Se presentan los protocolos emplea dos en la síntesis de AuNRs, la disolución de queratina empleada para la bioconjugación de AuNRs, así como de la adsorción de arsenito a AuNR bioconjugados en soluciones coloidales. La caracterización morfológica de AuNR solos y bioconjugados se realizó mediante microscopia electrónica de transmisión, mientras la composición de AuNRs solos, bioconjugados y el sensado de arsenito a AuNR bioconjugados con queratina, en soluciones coloidales, se realizó mediante espectroscopias UV-VIS y de fotoelectrones de rayos X. Así mismo, se presenta el diseño e impresión de los dispositivos microfluídicos basados en papel y el protocolo para la lectura de soluciones de tinte vegetal empleando un sistema de lectura colorimétrico experimental.

La metodología para el diseño y fabricación de los componentes de un sensor de papel con nanovarillas de oro, se dividió en tres secciones:

2.1 Fabricación de nanosensores de oro.

2.1.1 Síntesis de nanorods de oro (AuNR) por el método de semilla.

2.1.2 Bioconjugación de AuNRs con queratina.

2.1.3 Caracterización morfológica de AuNR, AuNR bioconjugados (AuNR-Ker) y AuNR bioconjugados y expuestos a As^{3+} (AuNR-Ker/As) mediante microscopia electrónica de transmisión.

2.1.4 Caracterización de AuNRs y AuNR-Ker mediante espectroscopia UV-Vis y de fotoelectrones de rayos X.

2.1.5 Sensado AuNR-Ker a arsenito (As^{3+}), en soluciones coloidales, mediante espectroscopias UV-Vis y de fotoelectrones de rayos X.

2.2 Diseño y fabricación de dispositivos microfluídicos en papel (μ -PADs)

2.3 Lectura de soluciones de tinte vegetal empleando un sistema colorimétrico experimental

2.1 Fabricación de nanosensores de oro

2.1.1 Síntesis de nanorods de oro (AuNRs) por el método de semilla

La síntesis de AuNRs se llevó a cabo por el método mediado por semillas que consiste en la reducción rápida de iones de Au^{3+} a Au^0 con borohidruro de sodio a nanopartículas de oro (semillas) en una solución acuosa de CTAB. Después, se realiza un crecimiento direccional $\{001\}$ de las semillas para la generación de los AuNRs [35].

Reactivos

Ácido tetracloroáurico trihidratado ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, Sigma Aldrich, CAS 16961-25-4, 393.83 g/mol). Es un compuesto inorgánico, sólido y de color anaranjado [36].

Bromuro de cetiltrimetilamonio ($\text{C}_{19}\text{H}_{42}\text{BrN}$, Sigma Aldrich, CAS 57-09-0, 364.45 g/mol). Es un tensoactivo de amonio cuaternario con densidad de carga positiva [37].

Nitrato de plata (AgNO_3 , Sigma Aldrich, CAS 7761-88-8, 169.87 g/mol). Es una sal inorgánica.

Borohidruro de sodio (NaBH_4 , Sigma Aldrich, CAS 16940-66-2, 37.83 g/mol). Es una sal de sodio inorgánica y un tetrahidridoborato de metal, de color blanco a grisáceo [38].

Ácido ascórbico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$, Sigma Aldrich, CAS 50-81-7). Es un polvo cristalino de color blanco a amarillo muy pálido casi sin olor con propiedades reductoras [39].

Equipos

Espectrofotómetro UV-Vis

El espectrofotómetro UV-Vis (**Figura 2.1**) fue utilizado para medir la absorbancia a diferentes longitudes de onda. El modelo de este equipo es el Nanodrop One C que incluye el sistema de retención de muestras de microvolumen (pedestales) y el portacubetas para analizar muestras diluidas con cubetas de cuarzo UV-visibles estándar. En este caso utilizamos la opción de medición de muestra de microvolumen con los pedestales ya que se necesita un volumen de 2 μL de la muestra. Las características técnicas del equipo incluyen:

- Fuente de luz: lámpara de xenón
- Intervalo de longitud de onda: 190-850 nm
- Precisión de longitud de onda: 0.5 nm
- Volumen de muestra: 1-2 μL



Figura 2.1. Espectrofotómetro Nanodrop One C. Tomada de [40].

Protocolo de síntesis de AuNRs

La síntesis de AuNRs se divide en las siguientes etapas:

- a) *Síntesis de la semilla.* Se preparó una disolución de CTAB por sonicación (5.0 mL, 200 mM, T=32 °C y 1000 RPM), seguido de la adición de una alícuota de HAuCl₄·3H₂O (5 mL, 0.5 mM) bajo agitación constante. A la disolución resultante se le agregó una alícuota de NaBH₄ recién enfriado (0.60 mL, 10 mM, T= 4°C) con agitación vigorosa. La disolución adquirió un color marrón.
- b) *Disolución de crecimiento.* A una disolución de CTAB (12.5 mL, 200 mM, 25 °C) se le agregó AgNO₃ (0.30 mL, 4.0 mM) bajo agitación constante. A la disolución resultante se le adicionó HAuCl₄·3H₂O (25.0 mL, 1.0 mM) la cual viró a naranja. Posteriormente se agregó ácido ascórbico (0.35 mL, 78.8 mM) bajo agitación constante, la disolución se volvió incolora por la reducción de Au³⁺ a Au⁺.
- c) *Síntesis de los AuNRs.* Se tomó una alícuota de 35 µL de la disolución semilla y se agregó a la de crecimiento (T=25 °C, 1000 RPM), se observó que la disolución se tornó gradualmente a azul intenso.
- d) *Sobrecrecimiento.* Se tomaron 15 mL de la solución con AuNRs previamente sintetizada y se le agregó ácido ascórbico (78.8mM, 5µL/5min por goteo controlado), tornándose la solución ligeramente verdosa. Bajo estas condiciones, la relación de aspecto (AR) esperada es ~2.5.
- e) *Concentración.* Se tomó una alícuota de 7.5 mL de la solución de AuNRs y se concentraron por centrifugación (14 krpm, 5min, 32 °C) a 3 mL, quedando a una concentración de 2.5x.
- f) *Lavados.* Se realizaron tres lavados con agua desionizada (4 min, 25 °C) con el objetivo de eliminar el exceso de CTAB.

2.1.2 Bioconjugación de AuNRs con queratina

Disolución de queratina (Ker)

La queratina (Ker) se empleó para bioconjuguar la superficie de los AuNRs. Esta es una proteína insoluble en agua, lo que significa que no se dispersará ni actuará fácilmente con el coloide de los nanorods de oro en su estado natural. Por lo tanto, es necesario disolver la queratina en una disolución adecuada antes de realizar la bioconjugación. El propósito de la utilización de la queratina es para que actúe como un agente de bioreconocimiento o captura selectiva para los iones de As³⁺ presentes en una muestra. Por otro lado, los nanorods de oro, pueden proporcionar una plataforma de detección

sensible y amplificar las señales de detección. Esto significa que cuando los iones de arsénico están presentes en una muestra, se unirán a los grupos sulfhidrilos de la queratina en los nanorods de oro, lo que generará una señal detectable, como un cambio de color.

Reactivos

Para la síntesis de AuNRs se emplearon los siguientes reactivos:

Queratina (X-FUSION). Diminutas fibras orgánicas de colores que están hechas de proteína de queratina pura, la misma proteína que forma el cabello humano. Las fibras X-Fusion llenan de manera instantánea y segura el cabello que una persona ya tiene, dándole la apariencia de tener mucho más cabello.

Las queratinas suelen clasificarse en tipos α y β . La alfa queratina (**Figura 2.2**) es una cadena polipeptídica que forma una hélice alfa. Dos de estas cadenas polipeptídicas se enrollan entre sí formando una estructura helicoidal llamada hélice superenrollada; estos dímeros de hélices están unidos por medio de enlaces disulfuro, utilizando los numerosos aminoácidos de cisteína que se encuentran en las alfa-queratinas.

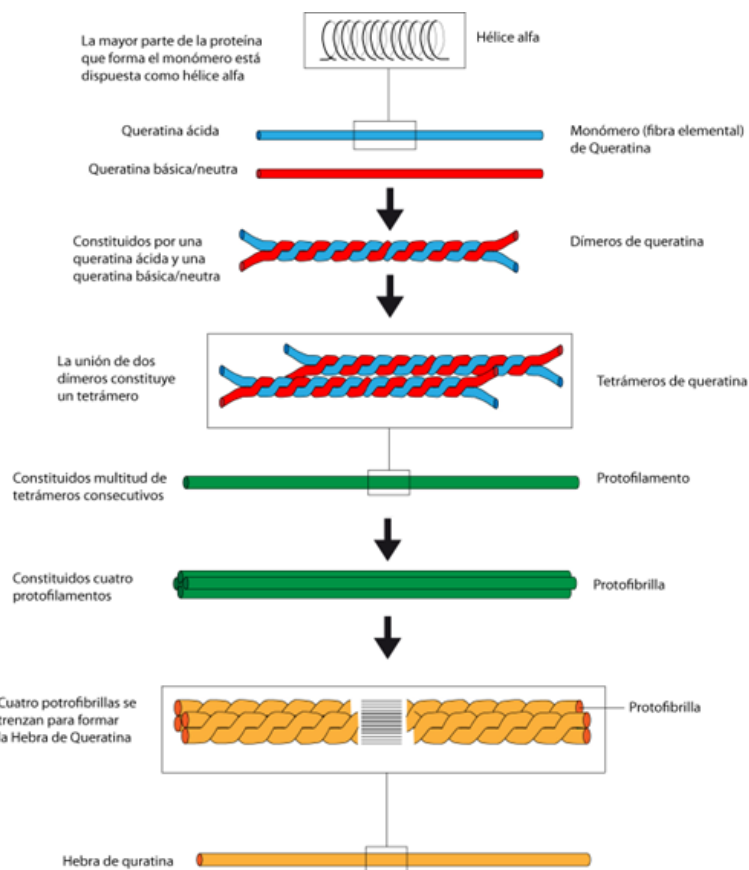


Figura 2.2. Estructura de la queratina

Entonces dos dímeros se unen entre sí para formar tetrámeros. Varios tetrámeros se unen entre sí para formar protofilamentos. Dos protofilamentos se juntan para formar una protofibrilla y cuatro protofibrillas se polimerizan para formar los filamentos intermedios, que son la subunidad básica de las queratinas alfa como se muestra en la [41].

En el caso de la queratina α se presentan los residuos de cisteína, los cuales constituyen puentes disulfuro, lo que se denomina grupo cistina, como se muestra en la **Figura 2.3**, la cual es una estructura representada por dos cadenas polipeptídicas. [42].

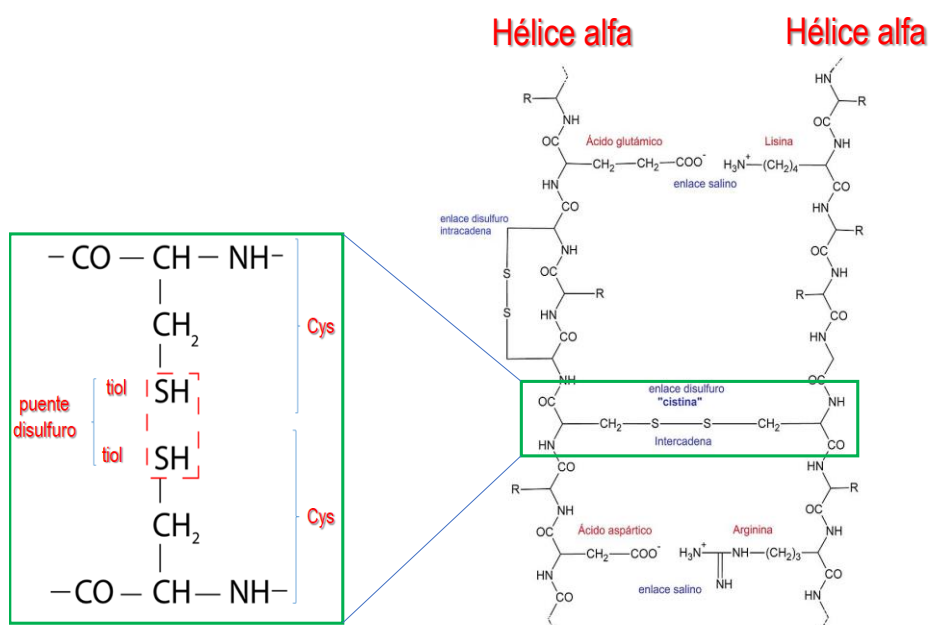


Figura 2.3. Estructura representativa de la queratina

Nitrógeno gas de alta pureza (Infra). Gas incoloro, inodoro, no inflamable e inerte.

Etanol absoluto (Sigma). Es un líquido transparente e incoloro con una alta concentración de etanol, generalmente alrededor del 99% o más pureza.

Acetona (JT Baker). Es compuesto químico orgánico que pertenece a la familia de las cetonas. Es un líquido incoloro, volátil y altamente inflamable.

Cloruro de 1-butil-3-metilimidazolio (BMIm⁺Cl⁻). Es un líquido iónico, que consiste en un catión de 1-butil-3-metilimidazolio y un anión de cloruro. Los líquidos iónicos son sales líquidas a temperatura ambiente que tienen propiedades interesantes, como baja volatilidad, alta estabilidad térmica y baja inflamabilidad. Se ha utilizado en diversas aplicaciones, como disolvente en reacciones químicas, catalizadores, extracción de sustancias, y como estabilizante en la síntesis y funcionalización de nanomateriales. También se ha utilizado en biotecnología y biocatálisis debido a su capacidad para

disolver biomoléculas, como proteínas y enzimas. Es conocido por su baja toxicidad y su capacidad para disolver una amplia gama de compuestos polares y no polares, lo que lo convierte en una opción atractiva para disolver biomoléculas insolubles en agua, como la queratina, lo que la hace útil en la bioconjugación de nanorods de oro para diversas aplicaciones.

Equipos

Microcentrífuga (Sorvall Legend Micro 21R). La centrifuga se utilizó para separar componentes de una mezcla líquida o suspensión, mediante la aplicación de una fuerza centrífuga. Estas fuerzas hacen que los componentes más densos se sedimenten en el fondo del tubo de centrifuga y los menos densos se queden en la parte superior. Las características técnicas del equipo incluyen:

- a) Capacidad: 24 x 1.5/2 ml
- b) RCF máxima: 21 100 x g
- c) Velocidad máxima: 14800 rpm

Liofilizadora (FreeZone Labconco). La liofilizadora (**Figura 2.4**) se utilizó para llevar a cabo el proceso de liofilización. El proceso de liofilización implica congelar el material en un estado sólido y luego someterlo a vacío para eliminar el agua presente en forma de hielo, sin pasar por el estado líquido. Esto se logra mediante sublimación, que es la transición directa del hielo a vapor, evitando así el daño causado por la formación de cristales de hielo grandes. Consiste en una cámara de vacío hermética donde se coloca el material a liofilizar. El equipo aplica un enfriamiento para congelar el material y luego reduce la presión en la cámara para permitir la sublimación del agua congelada. Además, la liofilizadora puede tener bandejas, estantes o recipientes para colocar el material de manera organizada durante el proceso. Las características técnicas del equipo incluyen:

- a) Capacidad: 2.5 L
- b) Temperatura: -50 °C



Figura 2.4. Liofilizadora FreeZone Labconco

Protocolo de disolución de queratina (Ker)

La disolución de la queratina a emplear en la bioconjugación de los AuNRs se divide en las siguientes etapas (**Figura 2.5**) [43]-[44]:

- a) *Purificación de queratina.* Se instaló un arreglo experimental de extracción Soxhlet con un baño de aceite para mantener el disolvente a una temperatura constante. Se preparó una disolución de 200 mL de etanol/acetona al 1:1 % v/v y se introdujo en el matraz de tres bocas. Las salidas laterales del matraz se sellaron con tapones esmerilados. Se instaló el soporte universal detrás de la parrilla de agitación y se montó el extractor soxhlet. Posteriormente se pesaron 2 gramos de Queratina (XFusion) y se envolvieron en el papel filtro para poder introducirlo en el extractor soxhlet. Se instaló el refrigerante (de bolas) y se ajustaron las mangueras de látex para la entrada y salida de agua (**Figura 2.5a**). La parrilla se ajustó a 250 rpm y a 140 °C. Se mantuvo durante 48 horas bajo agitación y temperatura (para que existiera reflujo)
- b) *Lavado de queratina.* Después de completar el ciclo de extracción, se retiró el papel filtro con la queratina purificada y se lavó con abundante agua desionizada para eliminar cualquier residuo.
- c) *Secado de queratina.* Se introdujo la queratina envuelta en papel filtro en un tubo eppendorf y se metió a ultracongelar por dos horas. Una vez transcurrido el tiempo, se introdujo en un matraz para liofilizar por 24 horas.
- d) *Disolución de queratina.* En este paso, se instaló un matraz de tres bocas en un baño de aceite sobre una parrilla de agitación magnética que se ajustó a 300 RPM y 250 °C, se taparon dos bocas con tapones esmerilados y la tercera con un tapón septa por donde se introdujo mediante una aguja el flujo de N₂ para poder agregar el BMIm⁺Cl⁻, una vez que el solvente se volvió líquido y cristalino se agregó la queratina purificada y también seca para que se mezclara con el BMIm⁺Cl⁻ (**Figura 2.5b**). La disolución se realizó mediante agitación y calentamiento, permitiendo que la queratina se solubilizara en el BMIm⁺Cl⁻. El flujo de N₂ se dejó durante 8 horas. Pasadas las 8 horas, se dejó reposar sin aplicarle temperatura y con el flujo de N₂ durante 24 horas.
- e) *Obtención de BMIm⁺Cl⁻.* Después de la disolución completa de la queratina en BMIm⁺Cl⁻ se obtuvo una solución homogénea (**Figura 2.5c**) que contenía el complejo BMIm⁺Cl⁻ con queratina disuelta a la cual se le agregó 200 mL de agua desionizada con la finalidad de que el BMIm⁺Cl⁻ se hidratara. Esta solución se separó de cualquier residuo sólido o impurezas mediante filtración (**Figura 2.5d**), obteniendo así la solución pura de BMIm⁺Cl⁻ con queratina disuelta.
- f) *Destilación de BMIm⁺Cl⁻.* Para obtener BMIm⁺Cl⁻ sin la queratina disuelta, se llevó a cabo un proceso de destilación, con el objetivo de reutilizar el BMIm⁺Cl⁻ en futuros experimentos (**Figura**

2.5e).

g) *Secado de $BMI_m^+Cl^-$* . El $BMI_m^+Cl^-$ obtenido a través de la destilación se sometió a un proceso de secado para eliminar cualquier rastro de humedad mediante liofilización.

h) *Centrifugación de $BMI_m^+Cl^-$* . Finalmente, la queratina que se obtuvo se lavó con agua desionizada, se centrifugó para eliminar cualquier residuo y se liofilizó (**Figura 2.5f**).

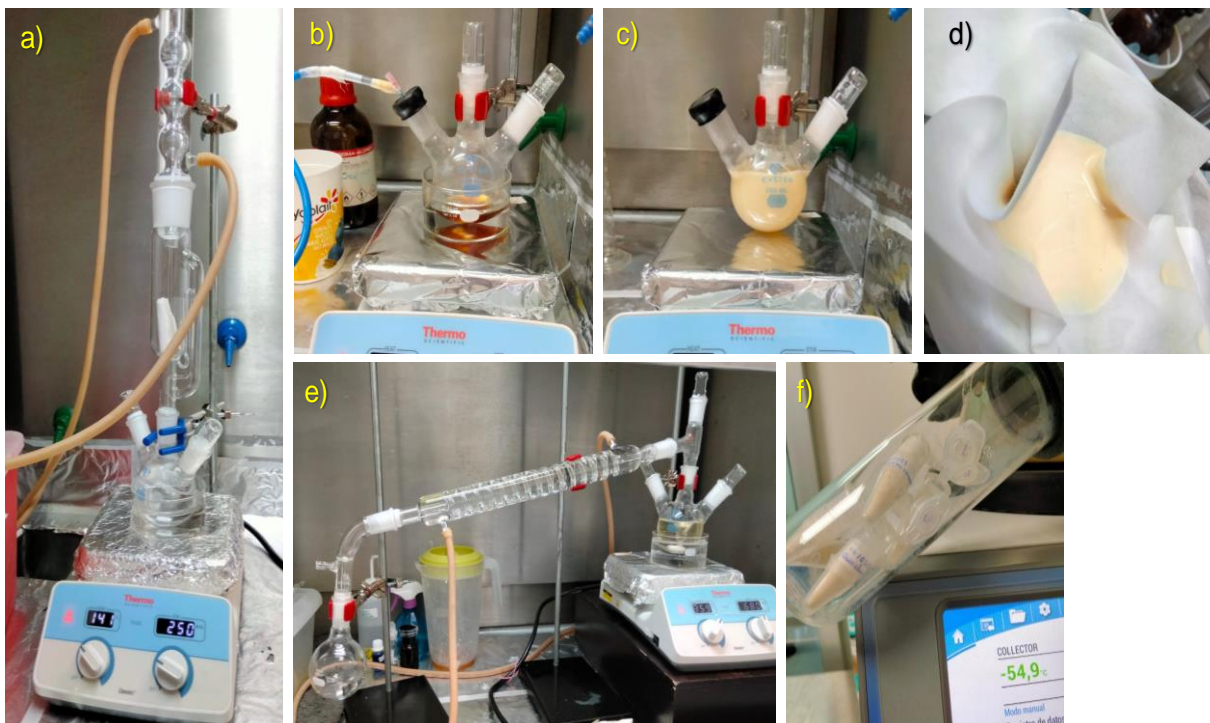


Figura 2.5. Obtención y purificación de queratina (Ker). a) Arreglo experimental, b) disolución de Ker, c) hidratación de $BMI_m^+Cl^-$, d) filtración de complejo $BMI_m^+Cl^-/Ker$, e) destilación de $BMI_m^+Cl^-$ para su recuperación, f) liofilizado de queratina purificada.

Bioconjugación de los AuNRs con la queratina

La bioconjugación involucra la unión de moléculas biológicas, como proteínas, a una superficie inorgánica, como los nanorods de oro (AuNRs). En este caso, la bioconjugación se refiere al proceso de anclar sobre los nanorods de oro con queratina, una proteína, para mejorar su funcionalidad y permitir su aplicación en la detección de As^{3+} .

Reactivos

Para la bioconjugación de AuNRs con queratina se emplearon los siguientes materiales:

Nanorods de oro (AuNRs). Nanorods de oro previamente sintetizados (Protocolo 2.1.1).

Queratina. Queratina obtenida con el protocolo descrito anteriormente (Protocolo 2.2.3).

Protocolo de bioconjugación de AuNRs con queratina (AuNRs-Ker)

La bioconjugación de AuNRs con Ker se divide en las siguientes etapas (**Figura 2.6**) [45]:

a) Preparación de las disoluciones:

- Se preparó una solución de nanorods de oro a una concentración de ~1.3 mg/mL.
- Se preparó una disolución de queratina a 1 y 2 mg/mL en agua desionizada.

b) Mezcla de las soluciones:

- Se transfirió una alícuota de 100 μ L de la disolución de queratina a un tubo eppendorf.
- Se agregaron 100 μ L de la disolución de nanorods de oro a la disolución de queratina.

c) Agitación de la mezcla

La mezcla de nanorods de oro y queratina se puso en agitación en un vortex a temperatura ambiente por una hora.

d) Separación y lavado:

- Después de la agitación, la mezcla se centrifugó a 10 krpm para sedimentar los nanorods de oro bioconjugados. Esto permitirá separar los nanorods de oro no conjugados y eliminar el exceso de queratina y otros reactivos.
- Se retiró el sobrenadante cuidadosamente, evitando perturbar el sedimento de nanorods de oro. Los nanorods de oro bioconjugados se resuspendieron en agua desionizada para su posterior uso en la detección de As (III).

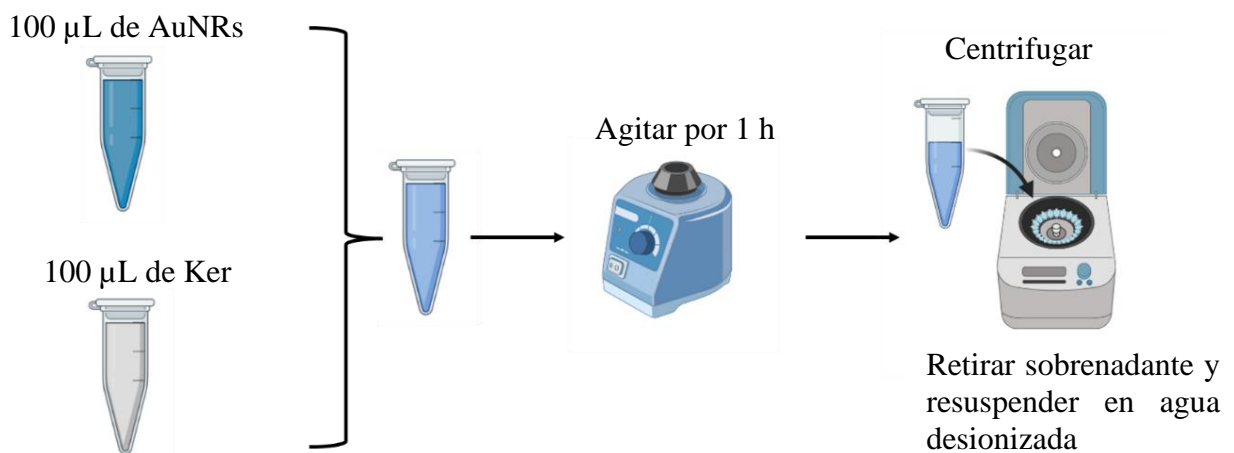


Figura 2.6. Proceso de la bioconjugación de los AuNRs con la queratina.

Los experimentos se resumen en la **Tabla 2.1** donde se muestra la nomenclatura, la concentración de queratina (Ker, mg/mL) y las diferentes relaciones en volumen que se utilizaron entre los AuNRs:Ker y AuNRs-Ker:As.

Tabla 2.1. Resumen de experimentos.

Nomenclatura	Concentración de Ker (mg/mL)	Relación AuNRs:Ker	Relación AuNRs-Ker:As
M111	1	1:1	2:1
M221	2	2:1	2:1

2.1.3 Caracterización morfológica de AuNR y AuNR bioconjugados (AuNR-Ker) mediante microscopia electrónica de transmisión

Las muestras de nanorods de oro se enviaron a un laboratorio de caracterización especializado en TEM. En el laboratorio, las muestras fueron depositadas en rejillas de carbono sin tinción previa y se realizó la captura de imágenes de alta resolución en diferentes ampliaciones, para determinar su morfología y tamaño de partícula empelado el software ImagenJ sobre 30 a 50 nanorods por cada micrografía, dependiendo de la densidad presente.

2.1.4 Caracterización de AuNRs y AuNR-Ker mediante espectroscopia UV-Vis y de fotoelectrones de rayos X

Para la caracterización mediante UV-Vis, las muestras se prepararon en forma de coloides, lo que implica que se encontraban en suspensión en agua. Los espectros de absorción se obtuvieron mediante la medición directa de 2 μ L de muestra en el pedestal del espectrofotómetro empleado. Durante la medición, el espectrofotómetro registró la absorbancia de la luz en función de la longitud de onda en el rango UV-Vis.

Para el análisis mediante XPS, las muestras se prepararon depositando 1 μ L sobre un sustrato de vidrio. El sustrato tenía dimensiones de aproximadamente 0.8 por 0.8 cm y servía como base para el análisis. Las muestras preparadas se dejaron secar en el sustrato de vidrio y posteriormente se analizaron en un equipo de espectroscopia de fotoelectrones de rayos X (XPS) (K-Alpha X-ray Photoelectron Spectrometer de Thermo Fisher Scientific).

2.1.5 Sensado de AuNR-Ker a arsenito (As^{3+}) en soluciones coloidales, mediante espectroscopias UV-Vis y de fotoelectrones de rayos X

El proceso de detección comienza con la bioconjugación de los nanorods de oro con queratina. Esto implica la unión de los tioles de la queratina a la superficie de los nanorods de oro, lo que permite

que las partículas sean estables y se puedan manipular de manera controlada. Luego, se realiza la detección colorimétrica de los iones de arsénico As^{3+} . Los iones de arsénico presentes en la muestra se unen selectivamente a los grupos sulfhidrilos (-SH) de la cisteína, que está anclada en la superficie de los nanorods de oro. Esta unión induce un cambio en las propiedades ópticas de los nanorods de oro, lo que resulta en un cambio de color observable a simple vista. Este cambio de color se puede cuantificar y relacionar con la concentración de iones de arsénico presentes en la muestra. Para ello, se pueden utilizar técnicas de espectroscopía o análisis de imágenes para medir y analizar el cambio de color de los nanorods de oro bioconjugados. La detección colorimétrica de nanorods de oro bioconjugados con queratina ofrece una forma rápida, sensible y específica de detectar la presencia de iones de arsénico en una muestra. Además, este enfoque presenta ventajas como la simplicidad de uso, la posibilidad de detección visual sin la necesidad de equipos sofisticados y la potencial aplicación en campos como la detección de contaminantes en el agua o el monitoreo ambiental.

Reactivos

Para la detección colorimétrica de AuNRs bioconjugados con queratina se emplearon los siguientes materiales:

Solución estándar de As^{3+} para ICP. La solución estándar de As^{3+} (Sigma Aldrich, CAS 72718) es una solución preparada que contiene una concentración de 1 g/L de As^{3+} en ácido clorhídrico.

Nanorods de oro bioconjugados con queratina (AuNRs-Ker). Nanorods de oro bioconjugados con queratina (protocolos 2.3.2).

Protocolo de detección de As^{3+} con AuNRs bioconjugados con queratina (AuNRs-Ker-As)

La disolución de la queratina se divide en las siguientes etapas:

a) Preparación de las disoluciones.

- Se preparó una disolución madre arsénico (As^{3+}) a una concentración de 4 mg/L.
- Se prepararon disoluciones de As^{3+} a partir de la disolución madre a distintas concentraciones: (0, 2, 4, 6, 8, 10 y 50 $\mu\text{g/L}$).

b) Ensayo de detección colorimétrica.

- Se agregó una alícuota de 200 μL de AuNRs-Ker a un tubo cónico eppendorf.
- En el mismo tubo eppendorf se agregó una alícuota de 100 μL de una disolución de As^{3+} a 2 $\mu\text{g/L}$.
- Este proceso se repite con las distintas concentraciones de As^{3+} : (0, 2, 4, 6, 8, 10 y 50

$\mu\text{g/L}$).

c) *Medición de espectro de absorbanza en el espectrofotómetro UV-Vis.*

- Se midió cada espectro del paso anterior en el espectrofotómetro UV-Vis, depositando 2 μL en el pedestal.

2.2 Diseño y fabricación de dispositivos microfluídicos basados en papel (μPADs)

Equipos

Los equipos utilizados para la fabricación de los μPADs son los siguientes:

Impresora de tinta sólida (ColorQube 8580). También conocida como impresora de cera, es un tipo de impresora que utiliza bloques de tinta sólida en lugar de tinta líquida para imprimir en papel u otros materiales. A diferencia de las impresoras de inyección de tinta convencionales, las impresoras de tinta sólida no utilizan cartuchos de tinta líquida, sino que emplean bloques de tinta en forma sólida que se funden y se aplican al papel para crear la impresión. La impresora utilizada fue una ColorQube 8580 de Xerox (**Figura 2.7**). En este trabajo se probaron amarillo, verde, rosa, azul y negro para la impresión de los canales sobre papel Whatman No. 1.



Figura 2.7. Impresora ColorQube 8580. Tomada de [46].

Horno de convección (Thermo Scientific). Empleado en el calentamiento de cera impresa sobre papel Whatman.

Protocolo de la fabricación de μPADs

La fabricación de los μPADs consta de cuatro etapas (**Figura 2.8**):

- a) Diseño en AutoCAD 2022 de los dispositivos microfluídicos basados en papel (μPAD).
- b) Impresión de los diseños de los μPADs en papel de celulosa Whatman No. 1 y en la impresora de tinta sólida.
- c) Calentamiento de los diseños en un horno de convección por 3 minutos a $T=166\text{ }^{\circ}\text{C}$ con el

propósito que la cera se impregnara en el papel.

d) Cubrir con plástico autoadherible la parte de atrás de la hoja para evitar filtraciones.



Figura 2.8. Diagrama experimental de la fabricación de los μ PAD.

Pruebas de μ PADs en soluciones acuosas

Se establecieron diferentes diseños de los μ PADs impresos sobre papel Whatman, variando el color de tinta: cian, magenta, amarillo y negro (CMYK), el ancho de canal, ancho de barrera, diámetro de la zona de sensado e inyección. Para ello, se emplearon soluciones de agua con colorante vegetal azul.

2.3 Lectura de soluciones de tinte vegetal empleando un sistema de lectura colorimétrica experimental

En el proceso de lectura de soluciones de tinte vegetal, se empleó un dispositivo de lectura colorimétrica experimental. El diseño y fabricación del dispositivo del sistema lector experimental fue realizado por Luis Alberto Romero León, estudiante de Licenciatura en Física Aplicada de la FCFM-BUAP. Así mismo, los experimentos de prueba descritos en esta sección, se realizaron en colaboración con el mencionado. El sistema lector experimental opera mediante la inserción del μ PAD en una pequeña bandeja (**Figura 2.9a**) equipada con un detector de colores RGB (*Red, Green, Blue*) (TCS34725). El detector se activa cuando un motor a pasos hace girar la bandeja en un ángulo específico, asegurando que el detector esté enfocado en las zonas de sensado del μ PAD. Los datos generados durante este proceso se capturan y procesan a través de un microcontrolador (PIC18F4550) de alto rendimiento que tabula los datos obtenidos. Una vez que los datos son procesados, se interpretan utilizando un programa (lenguaje C en microcontroladores) diseñado para este propósito. Los resultados de esta interpretación se muestran en una pantalla y se almacenan en una memoria *SD* en formato *.txt*. Estos archivos de texto pueden ser posteriormente abiertos y consultados utilizando cualquier lector de textos estándar.

Las pruebas de funcionamiento del dispositivo se encuentran aún en *protoboard* (**Figura 2.9b**), con el objetivo de validar y ajustar su desempeño antes de su implementación final.

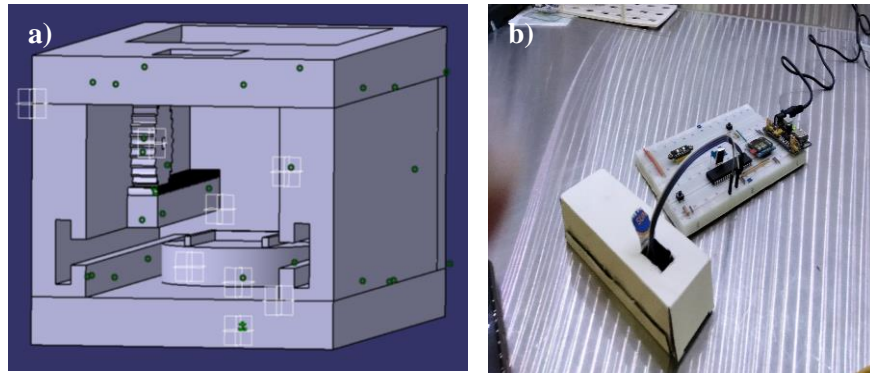


Figura 2.9. a) Carcasa del dispositivo y b) Pruebas de funcionamiento en protoboard del dispositivo de lectura colorimétrica.

Capítulo 3

Resultados y discusión

En este capítulo se presentan los resultados de la síntesis de nanorods de oro por el método de crecimiento mediado por semillas, su caracterización óptica mediante espectroscopia UV-Vis y su caracterización morfológica mediante TEM. Posteriormente, se muestran los resultados de la disolución de la queratina, así como su uso en la bioconjugación de los nanorods y en la detección de iones de As^{3+} . La detección de diferentes concentraciones de As^{3+} se realizó mediante espectroscopia UV-Vis y XPS. Así mismo, se presentan los resultados del diseño, impresión y sellado de los μ PADs, así como la prueba de concepto, sobre papel Whatman No. 1, de soluciones vegetales empleando un lector colorimétrico experimental.

Los resultados se dividen en tres secciones:

3.1 Fabricación de nanosensores de oro.

3.1.1 Síntesis de nanorods de oro (AuNR) por el método de semilla.

3.1.2 Bioconjugación de AuNRs con queratina.

3.1.3 Caracterización morfológica de AuNR, AuNR bioconjugados (AuNR-Ker) y AuNR bioconjugados y expuestos a As^{3+} (AuNR-Ker/As) mediante microscopia electrónica de transmisión.

3.1.4 Caracterización de coloides de AuNRs, AuNR-Ker y AuNR-Ker/As mediante espectroscopia UV-Vis.

3.1.5 Determinación de factores de calidad de sensores en solución coloidal.

3.1.6 Caracterización de AuNRs, AuNR-Ker y AuNR-Ker/As mediante XPS.

3.2 Diseño y fabricación de dispositivos microfluídicos en papel (μ -PADs).

3.3 Lectura de soluciones de tinte vegetal empleando un sistema de lectura colorimétrico experimental.

3.1 Fabricación de nanosensores de oro

3.1.1 Síntesis de nanorods de oro (AuNR) por el método de semilla

El proceso de síntesis de AuNRs se llevó a cabo por el método mediado por semillas, que inició con la preparación de las semillas de oro por reducción de sal de oro (**Figura 3.1a**). Su formación se debe a la reducción del precursor de oro, ácido tetracloroáurico trihidratado ($HAuCl_4 \cdot 3H_2O$), por el reductor Borohidruro de sodio, $NaBH_4$, cuya función es donar electrones para reducir los iones de oro presentes, a átomos de oro metálico. Ello conduce a la formación de semillas de oro nanométricas. Las semillas obtenidas (nanopartículas de oro esféricas y cuasiesféricas en solución coloidal) actúan como núcleos de crecimiento, para la formación de nanorods AuNRs [47].

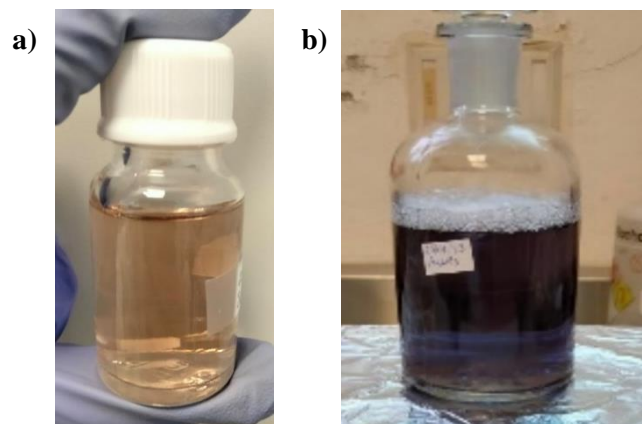


Figura 3.1. a) Solución semilla utilizada en la síntesis de AuNRs y b) Nanorods de oro.

Durante esta etapa, se agrega una solución de crecimiento que contenía los precursores de oro y los reactivos necesarios descritos en el protocolo de la sección 2.1.1, para el alargamiento y la formación de los nanorods (**Figura 3.1b**).

3.1.2 Bioconjugación de AuNRs con queratina

La disolución de queratina empleada en el proceso de bioconjugación en este trabajo, se determinó por su apariencia incolora, sin emplear otra caracterización adicional (**Figura 3.2**). Esta disolución se empleó en el proceso de bioconjugación de los nanorods de oro. La transparencia de la solución de queratina aseguró que no interfiriera con las propiedades ópticas o espectrales de los nanorods de oro, lo que es esencial para las aplicaciones posteriores de bioconjugación y detección de arsenito. Las muestras de nanorods solos y bioconjugados con queratina (AuNR-Ker) se caracterizaron ópticamente mediante espectroscopias UV-Vis (UV-Vis), de fotoelectrones de rayos X (XPS) y morfológicamente mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM).



Figura 3.2. Disolución de queratina.

3.1.3 Caracterización morfológica de AuNR, AuNR bioconjugados (AuNR-Ker) y AuNR bioconjugados y expuestos a As^{3+} (AuNR-Ker/As) mediante microscopia electrónica de transmisión

Se empleó TEM de alta resolución para determinar la morfología de los AuNRs, AuNRs bioconjugados con queratina (AuNRs-Ker) y AuNRs bioconjugados con queratina en presencia de iones de arsenito (AuNRs-Ker/As) en solución coloidal. Además de la morfología, se determinó la relación de aspecto de los nanorods como un parámetro importante en la caracterización.

La razón de aspecto (RA) de un AuNRs es la longitud L entre el ancho A del nanorod. Para su determinación se empleó el software de procesamiento de imágenes digitales ImageJ (de dominio público, programado en Java desarrollado, *National Institutes of Health*).

1. *Nanorods de oro (AuNRs)*. En la **Figura 3.3**, se presentan las micrografías de los nanorods de oro sin modificar. Estas imágenes confirman la morfología alargada esperada, que fue empleada para determinar su razón de aspecto, obteniendo un promedio y una desviación estándar de $\overline{RA} = 2.3 \pm 0.3$, determinada para 29 AuNRs (**Figura 3.4**).

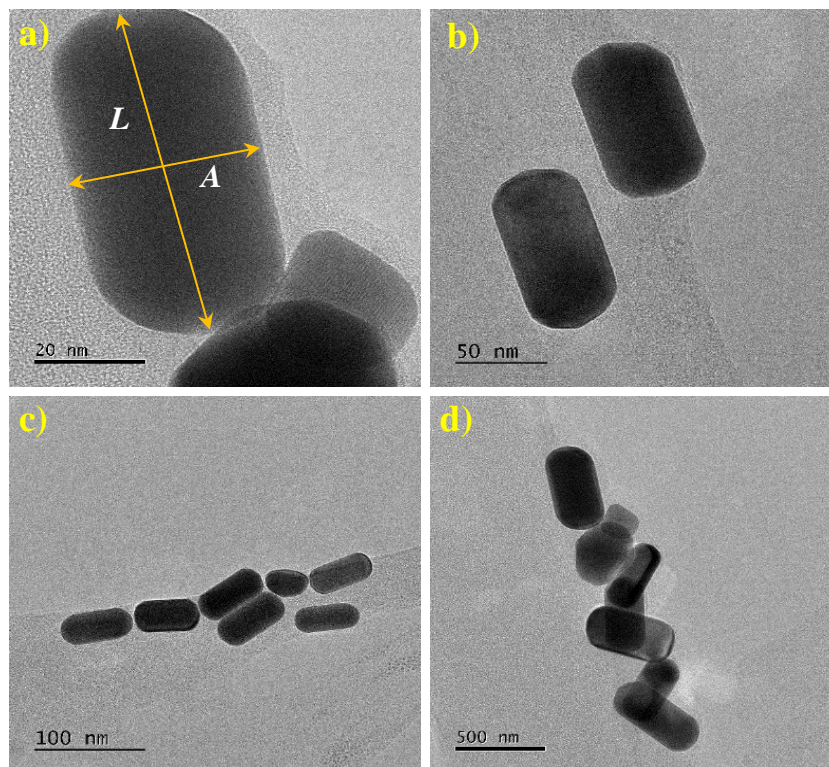


Figura 3.3. Micrografías TEM de AuNRs, en diferentes ampliaciones.

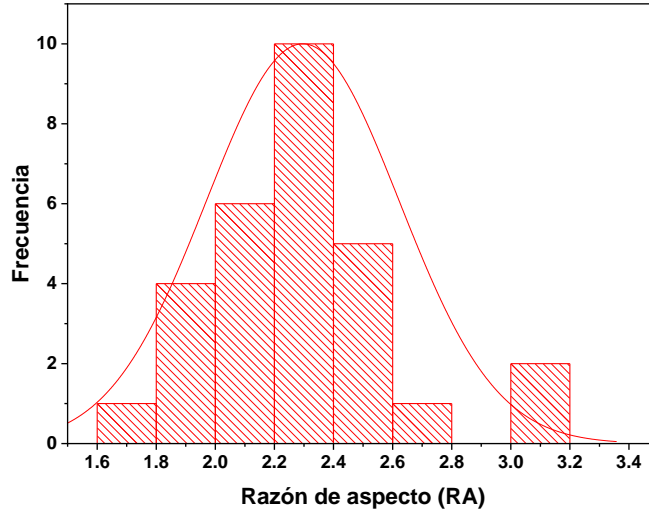


Figura 3.4. Histograma de la distribución de la razón de aspecto de los AuNRs no modificados, obtenidas mediante las micrografías TEM.

Para validar nuestros resultados, se empleó la ecuación propuesta por Eustis y El-Sayed [48],

$$\lambda_{\text{LSPR-L}} = 96.9 \text{ RA} + 385$$

$$\Rightarrow \text{RA} = \frac{\lambda_{\text{LSPR-L}} - 385}{96.9} \quad \therefore \text{RA} = \frac{623 - 385}{96.9} = 2.46$$

donde $\lambda_{\text{LSPR-L}}$ es de resonancia plasmónica superficial localizada longitudinal, obtenida a partir de los espectros de absorbancia UV-Vis. Se observa que el valor calculado de RA (2.46), utilizando esta ecuación, se encuentra dentro del rango obtenido experimentalmente. Esto sugiere que la ecuación propuesta por Eutis y El-Sayed brinda una buena aproximación de las razones de aspecto de los AuNRs fabricados por la técnica de crecimiento mediada por semillas.

2. *Nanorods de oro bioconjugados con queratina (AuNRs-Ker)* En la **Figura 3.5** se muestran las respectivas micrografías TEM de los AuNRs después de ser bioconjugados con queratina.

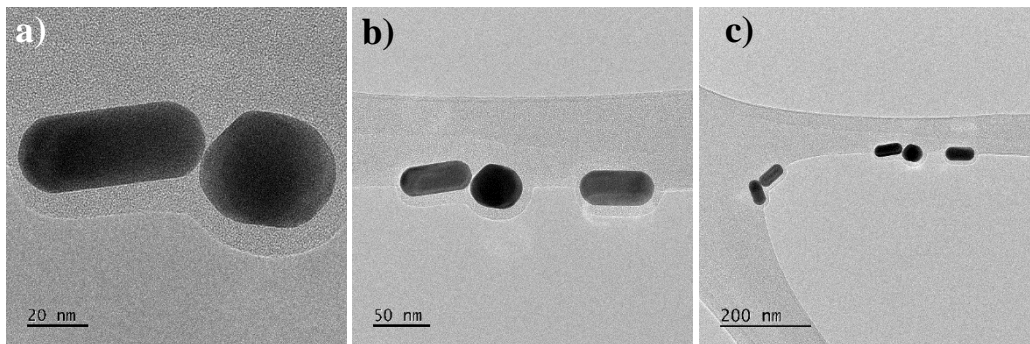


Figura 3.5. Micrografías de TEM de AuNRs bioconjugados con queratina, en diferentes ampliaciones.

Las relaciones de aspecto resultantes se presentan en forma de un histograma de frecuencias en la **Figura 3.6**, para 27 partículas por micrografía, las cuales varían en un rango de 1.8 a 4.4 y $\overline{RA} = 2.6 \pm 0.6$.

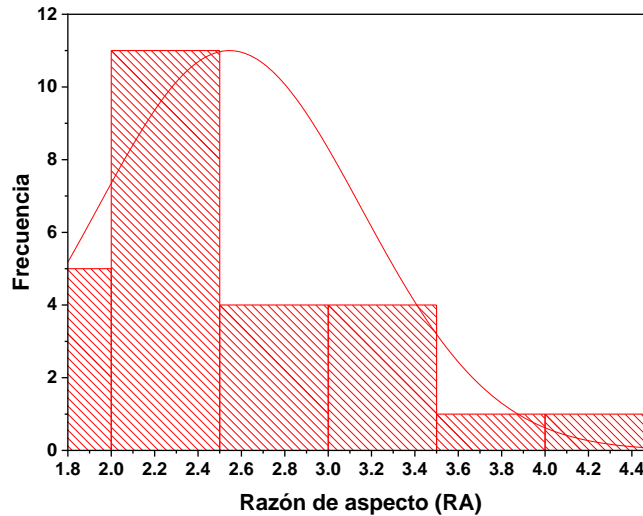


Figura 3.6. Histograma de la distribución de la razón de aspecto de los AuNRs bioconjugados con queratina obtenidas mediante las imágenes de TEM.

3. *Nanorods de oro bioconjugados con queratina en presencia de As^{3+} (AuNRs-Ker/As).* En la **Figura 3.7**, se observan las micrografías de los AuNRs-Ker/As, habiendo sido incubados los AuNRs-Ker en una solución de As^{3+} de $10 \mu\text{g/L}$.

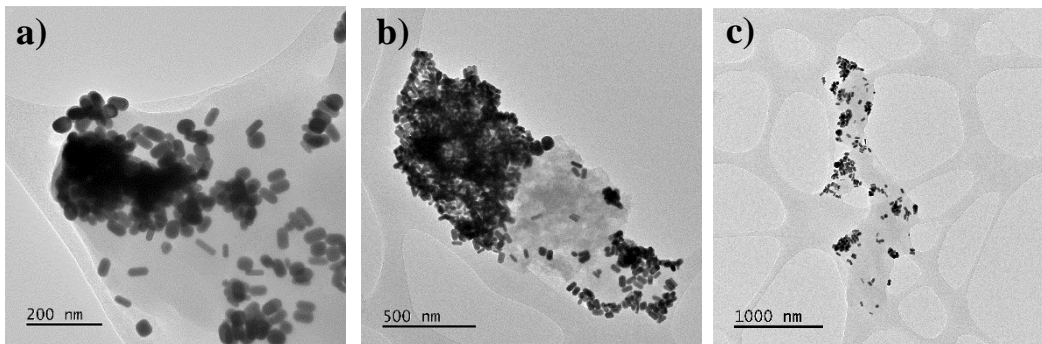


Figura 3.7. Micrografías de TEM de AuNRs bioconjugados con queratina y en interacción con As^{3+} .

Se aprecia la formación de agregados, lo que sugiere una interacción con los iones de arsenito. De acuerdo con estudios previos, la introducción de analitos en la solución de las nanopartículas bioconjugadas puede provocar la aglomeración de partículas, lo que resulta en un cambio de color y un desplazamiento hacia el infrarrojo de la banda LSPR [13]. Las relaciones de aspecto resultantes se presentan en forma de un histograma de frecuencias (**Figura 3.8**), con un total de 50 nanorods y un promedio y desviación estándar de $\overline{RA} = 2.3 \pm 0.6$.

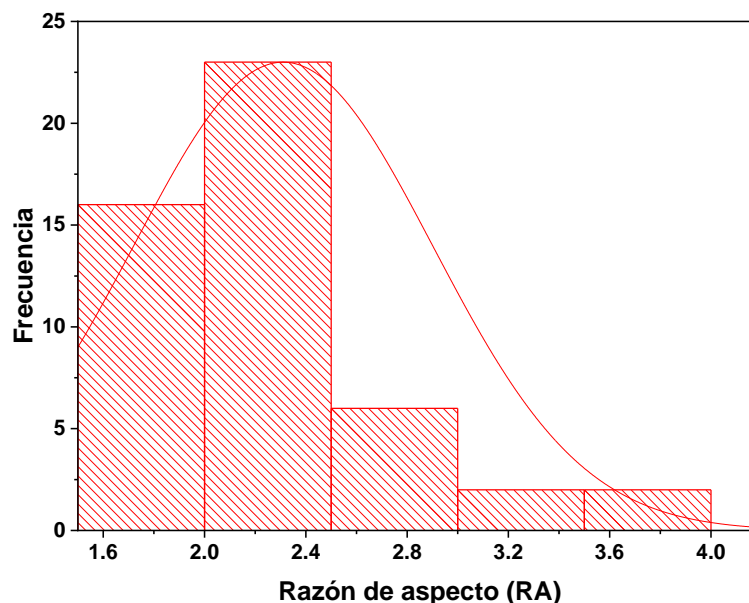


Figura 3.8. Histograma de la distribución de la razón de aspecto de los AuNRs bioconjugados con queratina y en interacción con As^{3+} obtenidas mediante las imágenes de TEM.

3.1.4 Caracterización de coloides de AuNRs, AuNR-Ker y AuNR-Ker/As mediante espectroscopia UV-Vis

Bandas plasmónicas de AuNRs

El proceso de síntesis de AuNRs se llevó a cabo por el método mediado por semillas, que inició con la preparación de la semilla (**Figura 3.1**), que es la solución inicial que contiene pequeñas partículas de oro llamadas semillas que actúan como núcleos de crecimiento para la formación de nanorods durante el proceso de síntesis. La determinación de las bandas plasmónicas localizadas de AuNRs y AuNR-Ker se realizó mediante espectroscopia UV-Vis.

La **Figura 3.9** muestra los espectros de absorbancia de los nanorods de oro (AuNRs), donde se observan dos bandas de absorción prominentes en la región de longitud de onda visible del espectro. La primera banda de absorción, ubicada en 523 nm, corresponde a la resonancia de plasmones superficiales localizados transversalmente T-LSPR en los AuNRs, mientras que la segunda banda de absorción, localizada en 623 nm, se atribuye a la resonancia de plasmones superficiales localizados longitudinalmente L-LSPR [49]. Entonces, la presencia de ambas bandas de absorción en los espectros confirma la formación de nanorods. Se incluyó la medición de absorbancia de las semillas utilizadas para la síntesis de los AuNRs (**Figura 3.11**). Su banda de absorción única alrededor de 450 nm, confirma su esfericidad y crecimiento selectivo de los AuNRs.

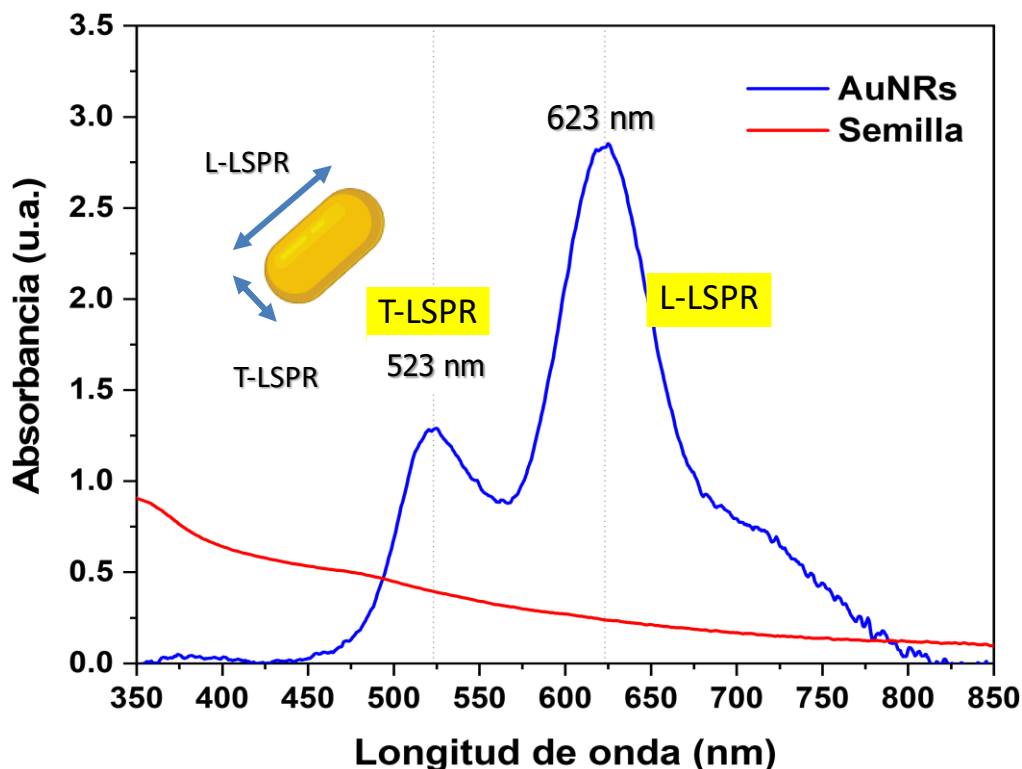


Figura 3.9. Espectros de absorción de semillas de oro y AuNRs.

Sensado de AuNR-Ker en soluciones coloidales a arsenito (As^{3+})

En la **Figura 3.10** se muestran los coloides de AuNRs bioconjugados con la queratina para las muestras M111_X (**Tabla 3.1**), donde el primer dígito hace referencia a la concentración de la queratina (1 mg/mL), los dos siguientes a la relación de AuNRs:Ker y X corresponde a la concentración de As^{3+} empleada (0, 2, 4, 6, 8, 10, 50 $\mu\text{g/mL}$).

Tabla 3.1. Resumen de experimentos, donde X corresponde a la concentración de As^{3+} empleada (0, 2, 4, 6, 8, 10 y 50 $\mu\text{g/mL}$).

Nomenclatura	Concentración de Ker (mg/mL)	Relación AuNRs-Ker	Relación AuNRs-Ker:As
M111	1	1:1	2:1
M221	2	2:1	2:1

Después de la agregación de las diferentes concentraciones de iones de As^{3+} se observa un cambio de tonalidad debido al fenómeno de la resonancia de plasmones de superficie localizados. Los AuNRs tienen una estructura alargada y están compuestos de oro, un metal que exhibe propiedades plasmónicas que se deben a la interacción entre el campo eléctrico y los electrones en

la superficie de las nanopartículas de oro.

M111_2 M111_4 M111_6 M111_8 M111_10 M111_50

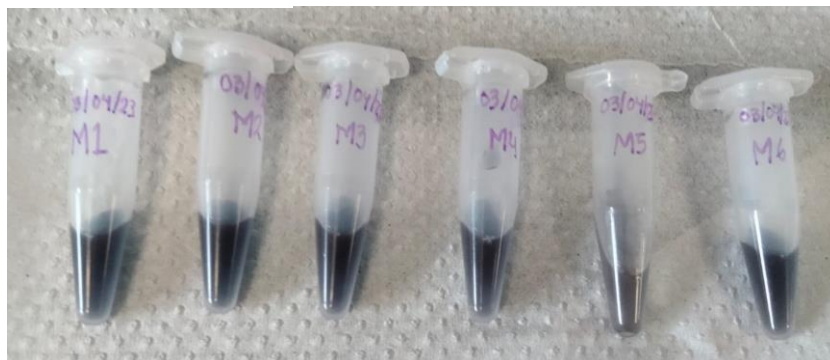


Figura 3.10. Coloides de AuNRs-Ker del experimento M111, después de la agregación de iones de As^{3+} .

Cuando los AuNRs no están interactuando con queratina ni en presencia de iones de As^{3+} , exhiben una resonancia plasmónica característica. Esta resonancia ocurre cuando la frecuencia de la luz incidente coincide con la frecuencia natural de oscilación de los plasmones de superficie localizados en los AuNRs. Como resultado, los AuNRs absorben selectivamente la luz en una cierta longitud de onda y reflejan o transmiten el resto de la luz. En general, la longitud de onda de absorción depende de las dimensiones y la composición de los nanorods.

Sin embargo, cuando los nanorods de oro se bioconjugan con queratina y se exponen a los iones de As^{3+} , AuNR-Ker/As, se observa un cambio en las propiedades plasmónicas dado que se altera la distribución de carga en la superficie de los AuNRs, modificando la resonancia de los plasmones de superficie localizados.

Nivedita Priyadarshni y colaboradores [3] observaron un cambio en la banda longitudinal de plasmón superficial (LSPR) en nanorods de oro funcionalizados con polietilenglicol y ácido meso-2,3-dimercaptosuccínico (PEG-DMSA). Este cambio se debe a la agregación inducida por la unión de iones de arsénico (As^{3+}/As^{5+}) a los grupos sulfhidrilo (-SH) en la superficie de los nanorods. El desplazamiento en la longitud de onda de absorción se traduce en un cambio en la tonalidad de los AuNRs en coloide (**Figura 3.10**).

En la **Figura 3.11** se muestran los espectros de absorbancia para M111_X, dado que el fenómeno de la resonancia de plasmones de superficie localizados también interviene en el desplazamiento de las bandas de absorción de los nanorods de oro. Además, el desplazamiento de la resonancia plasmónica también puede manifestarse como un desplazamiento de las bandas de

absorción en el espectro de absorción de los nanorods de oro. Esto significa que la posición de los picos de absorción en el espectro, que corresponde a las longitudes de onda donde los nanorods de oro absorben luz, se modificará debido al cambio en las propiedades plasmónicas.

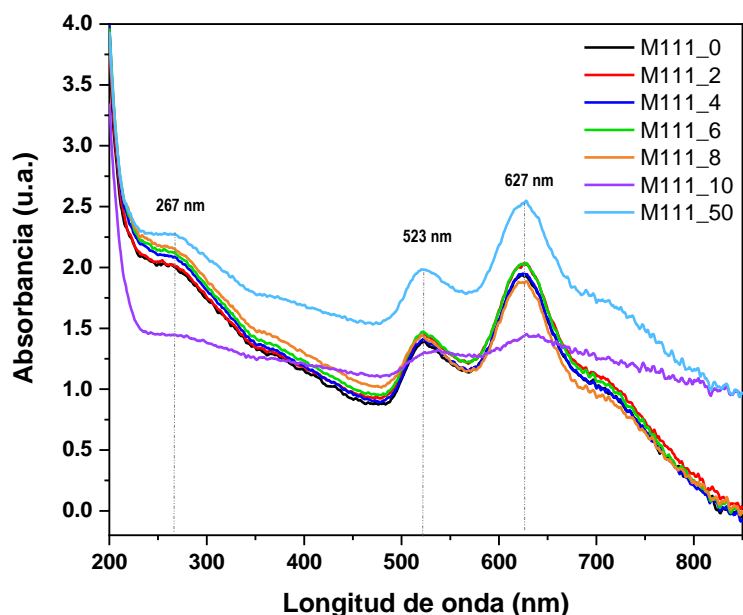


Figura 3.11. Espectros de absorción para los coloides bioconjugados AuNRs-Ker con el analito arsenito As^{3+} para las muestras M111_X.

Estos cambios en la longitud de onda se resumen en la **Tabla 3.2**, donde se obtiene el máximo de resonancia LSPR longitudinal experimental (λ_{L-LSPR}) y después de hacer un suavizado a los datos para disminuir el ruido durante la toma de datos.

Tabla 3.2. Máximo de resonancia LSPR longitudinal para los experimentos M111, después de la agregación de iones de As^{3+} .

Muestra	Concentración de As^{3+} ($\mu g/L$)	λ_{L-LSPR} (nm)	Suavizado de la curva λ_{L-LSPR} (nm)
M111_0	0	623.0	624.5
M111_2	2	625.5	627.0
M111_4	4	624.0	626.5
M111_6	6	627.5	627.0
M111_8	8	628.0	625.0
M111_10	10	628.5	634.0
M111_50	50	627.5	626.5

En el caso del experimento M221 ocurre algo similar. En la **Figura 3.12** se muestran los coloides de AuNRs-Ker antes y después de la agregación de las disoluciones de As^{3+} en diferentes

concentraciones. Como en el experimento anterior, se observan los cambios de tonalidad.

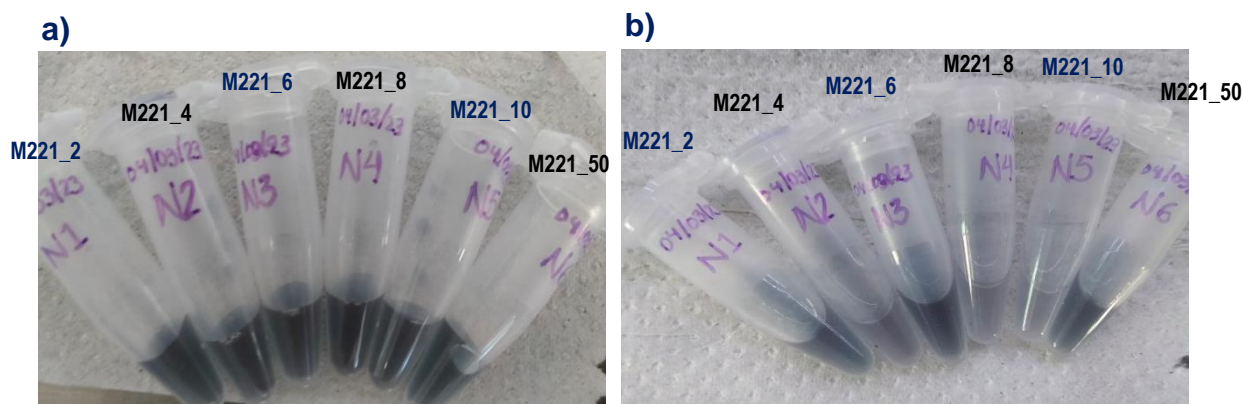


Figura 3.12. Coloides de AuNRs-Ker del experimento M221 a) antes y b) después de la agregación de iones de As^{3+} .

En la **Figura 3.13** se muestran los diferentes espectros y se observan cambios en la absorbancia y desplazamientos en la longitud de onda. Dichos cambios se resumen en la **Tabla 3.3**, donde se obtiene el máximo de resonancia LSPR longitudinal (λ_{L-LSPR}) y también se obtiene este máximo después de hacer un suavizado al espectro.

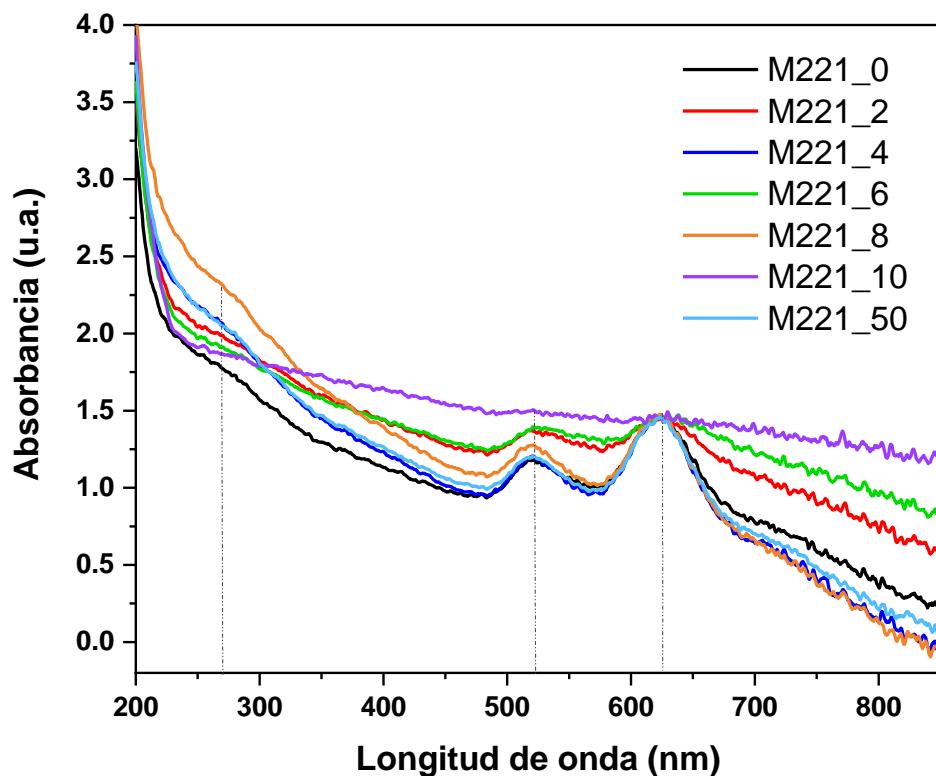


Figura 3.13. Espectros de absorbancia para los coloides bioconjugados AuNRs-Ker con el analito arsenito As^{3+} para las muestras M221_X.

Tabla 3.3. Máximo de resonancia LSPR longitudinal para los experimentos M221, después de la agregación de iones de As^{3+} .

Muestra	Concentración de As^{3+} ($\mu g/L$)	λ_{L-LSPR} (nm)	Suavizado de la curva λ_{L-LSPR} (nm)
M221_0	0	623.0	624.5
M221_2	2	625.5	627
M221_4	4	624.0	626.5
M221_6	6	627.5	627
M221_8	8	628.0	625
M221_10	10	628.5	634
M221_50	50	627.5	626.5

Particularmente, se aprecia el cambio en la razón de la absorbancia de las bandas plasmónicas localizadas longitudinal entre transversal como función de la concentración de arsenito en la solución analizada. Esta es una medición de la interacción de terminales NH^- de la queratina, con As^{3+} , hasta un concentración dada [50]. Es decir, a concentraciones de 50 $\mu g/mL$, los terminales NH^- ya están saturados. En el caso de las muestras M221_6, deberá ser repetido el experimento para asegurar que no se presentó aglomeración de los AuNR-Ker expuesto a As^{3+} . La **Tabla 3.4** resume las relaciones entre la absorbancia de la longitud de onda de resonancia longitudinal LSPR y la longitud de onda de resonancia transversal LSPR determinada para los experimentos M111_X y M221_X, donde X = 2, 4, 6, 8, 10 y 50 $\mu g/mL$ de As^{3+} .

Tabla 3.4. Razón de área bajo la curva de las absorbancias en las bandas LSRR para los experimentos M111 y M221, después de la agregación de iones de As^{3+} .

Experimento	A_{L-LSPR} / A_{T-LSPR}	Experimento	A_{L-LSPR} / A_{T-LSPR}
M111_0	2.06	M221_0	2.18
M111_2	2.1	M221_2	1.92
M111_4	2.06	M221_4	1.82
M111_6	2.08	M221_6	2.31
M111_8	2.02	M221_8	1.32
M111_10	1.58	M221_10	1.25
M111_50	2.29	M221_50	2.18

3.1.5 Determinación de factores de calidad de sensores en solución coloidal

De acuerdo al estudio reportado por Wei y colaboradores [35], el factor de calidad Q es definido como

$$Q = \frac{\omega_0}{\Delta\omega} = \frac{\omega_0}{\omega_2 - \omega_1} = \frac{\lambda_1\lambda_2}{\lambda_0(\lambda_2 - \lambda_1)}$$

donde $\omega_0 = 2\pi c/\lambda_0$, $\omega_1 = 2\pi c/\lambda_1$, $\omega_2 = 2\pi c/\lambda_2$, c es la velocidad de la luz en el vacío, λ_0 es el pico LSPR, es decir (λ_{LSPR-L}), y λ_1 y λ_2 son las longitudes de onda a la mitad de ese máximo (FWHM), que se puede determinar de los espectros de absorbancia para una muestra de interés. El valor de FWHM se puede asociar a la dispersidad de la muestra, donde valores mayores indican una mayor dispersión en los tamaños de las partículas de una muestra coloidal.

Tabla 3.5. Ancho a altura media (FWHM) y factor de calidad Q para las muestras M111_X. Se incluye la muestra AuNRs

Muestra	Ancho a altura media FWHM (nm)	Factor de calidad Q
AuNRs	73	8.54
M111_0	65.5	9.56
M111_2	66.0	9.46
M111_4	66.0	9.48
M111_6	63.5	9.78
M111_8	55.5	11.14
M111_10	109.0	5.81
M111_50	66.5	9.38

Empleando los espectros UV-Vis (**Figuras 3.11** y **3.13**) se determinaron los FWHM cuando muestras de AuNR-Ker fueron expuestas a disoluciones de arsenito a 2, 4, 6 8, 10 y 50 $\mu\text{g/L}$ en los dos experimentos propuestos de la **Tabla 3.1**, M111_X y M221_X. Así mismo, se determinó el FWHM para AuNRs y bioconjugados AuNR-Ker. Los resultados, se presentan en las **Tablas 3.5** y **3.6**.

Tabla 3.6. Ancho a altura media (FWHM) y factor de calidad Q para las muestras M221_X.

Muestra	Ancho a altura media FWHM (nm)	Factor de calidad Q
M221_0	62.5	9.95
M221_2	61	10.20
M221_4	75	8.43
M221_6	58.5	10.63
M221_8	110	5.72
M221_10	91.5	6.83
M221_50	62	10.06

En las **Figuras 3.14** y **3.15**, se grafican los valores correspondientes a Q para las muestras M111_X y M221_X. Según los datos de las **Tablas 3.3** y **3.4**, las muestras M111_10, M221_8 y M221_10 exhiben los valores más altos de FWHM (ancho a altura media). Estas muestras presentaron una mayor dispersión en sus espectros de absorbancia, con una menor definición de las dos bandas

características y una reducción en la absorción. Esta observación podría ser atribuible a la aglomeración y precipitación de los nanorods en las muestras coloidales, lo que resulta en una disminución de la absorbancia medida cuando se analiza en el espectrofotómetro UV-Vis.

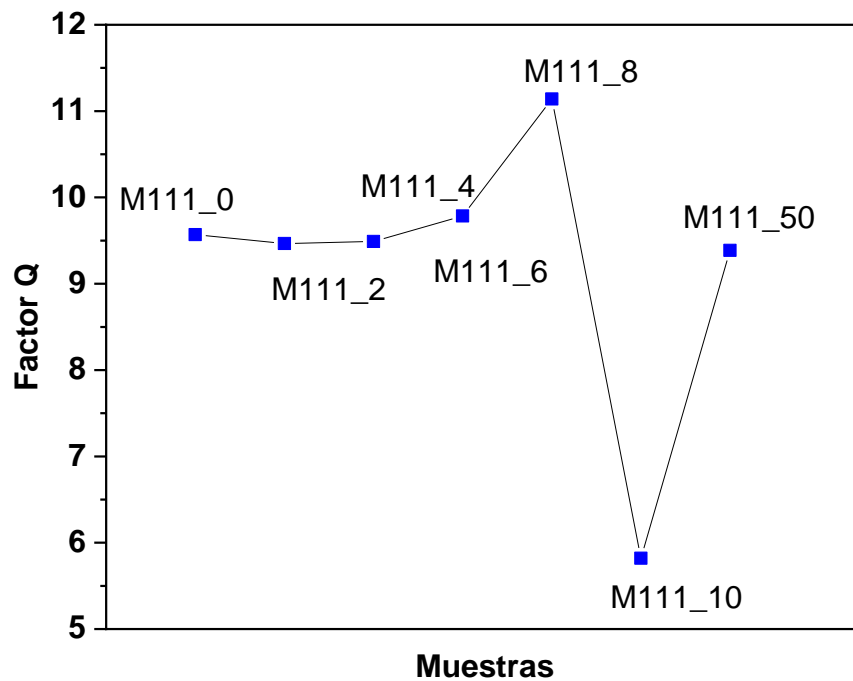


Figura 3.14. Factor Q de las muestras M111_X.

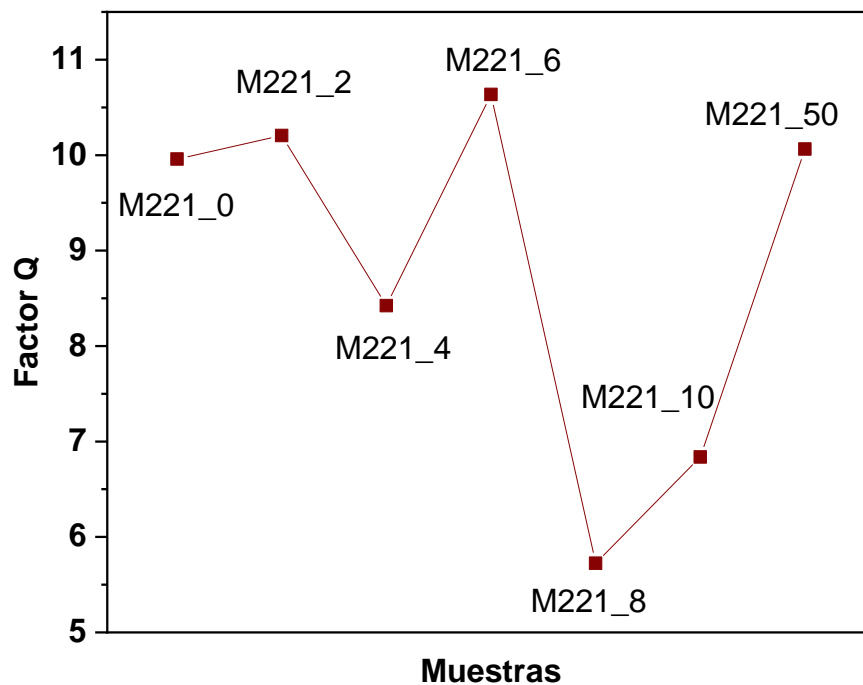


Figura 3.15. Factor Q de las muestras M221_X.

Los resultados obtenidos varían en un rango de 6 a 12, mientras que los reportados en el estudio

de Wei y colaboradores [35], se encuentran en el rango de 4 a 7. Es notable que los valores de FWHM que ellos obtuvieron son mayores en comparación con los obtenidos en este estudio, lo que sugiere una mayor dispersión en los tamaños de su muestra.

3.1.6 Caracterización de AuNRs, AuNR-Ker y AuNR-Ker/As mediante espectroscopia XPS

Este estudio se enfoca en la caracterización de nanorods de oro y su interacción con iones de arsenito utilizando espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS). La investigación adquiere importancia en el contexto de entender cómo los nanorods de oro se comportan en presencia de arsenito.

Se analizaron cinco tipos de muestras: nanorods de oro, nanorods de oro bioconjugados con queratina, nanorods de oro bioconjugados con queratina y en interacción con arsenito a 2, 10 y 50 $\mu\text{g/L}$ de las muestras M111.

Los resultados obtenidos se dividen en dos partes. En primer lugar, se presentan los datos sobre la composición química, específicamente el porcentaje de concentración atómica de los elementos de interés en cada una de las muestras. A continuación, se analiza la energía de enlace de todos los elementos de interés, representada mediante sus respectivos espectros.

Composición química de los compuestos

Este estudio se enfoca en la caracterización de nanorods de oro y su interacción con iones de arsenito utilizando espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X. XPS se empleó para determinar a) la concentración de los elementos componentes de los AuNRs, antes y después de la bioconjugación con queratina, y después de su exposición a soluciones estándar de arsenito, mediante sus espectros survey y b) para determinar su ambiente químico bajo las diferentes condiciones de los elementos constituyentes principales: C(1s), O(1s), N(1s), Au(4f), S(2p) y As(3d), mediante sus espectros a detalle. Se analizaron cinco tipos de muestras: nanorods de oro (AuNRs), nanorods de oro bioconjugados con queratina (AuNR-Ker), nanorods de oro bioconjugados con queratina y en interacción con arsenito a 2, 10 y 50 $\mu\text{g/L}$ (AuNR-Ker/As).

Composición química de los compuestos

Un espectro *survey* de XPS, brinda información de todos los elementos presentes en los últimos 10 nm de una muestra. Por su parte, el área bajo la curva de un pico a una determinada energía de enlace permite determinar la concentración presente de dicho elemento. En la **Figura 3.16**, se muestran los *surveys* de AuNRs, AuNR-Ker y de AuNR-Ker/As con concentración de arsenito de 2, 10 y 50 $\mu\text{g/L}$.

Se identificaron las señales correspondientes a C(1s), O(1s), N(1s), S(2p) y Si(2s) y Si(2p), así como de Br en sus orbitales 1s, 3p_{3/2} y 3d_{5/2}. La presencia de silicio puede atribuirse a su lectura dado que las muestras se depositaron en sustratos de vidrio para su análisis. Además, la presencia de bromo se deriva del uso de CTAB durante la fabricación de los AuNRs.

Dado que la cuantificación del área bajo la curva de para S(2p), Au(4f) y As(3d) es muy baja, es que se emplearon sus respectivos espectros a detalle para la determinación de su concentración.

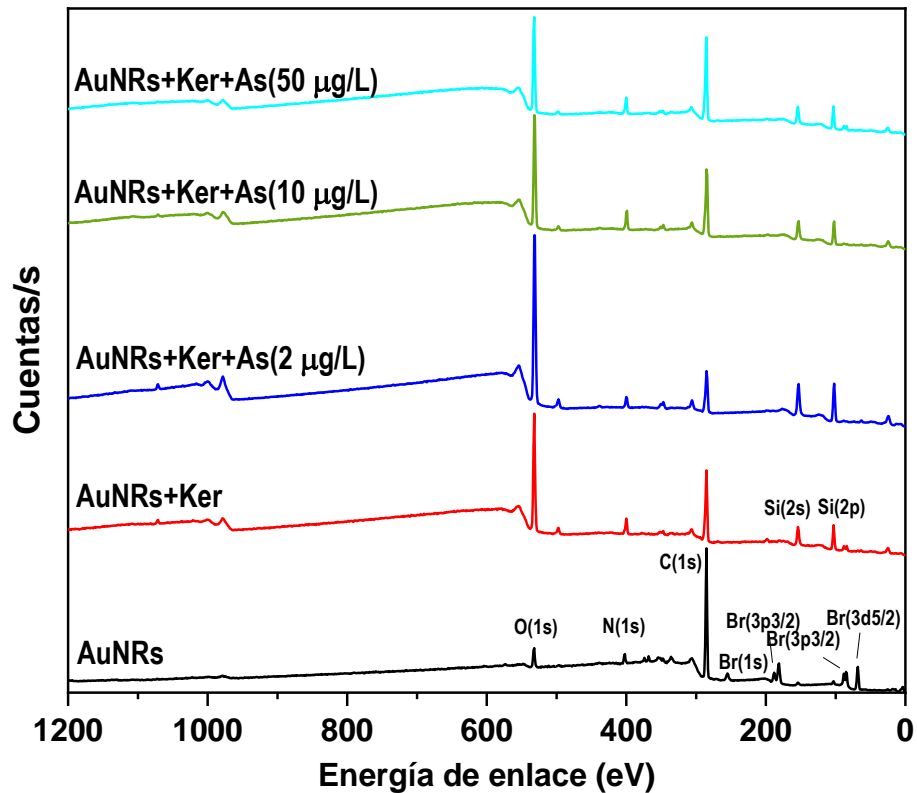


Figura 3.16. Espectro de barrido amplio de XPS.

La **Tabla 3.7.** resume la concentración porcentual elemental de C(1s), N(1s), O(1s), S(2p), Au(4f) y As(3d), que son los elementos de interés presentes, donde la presencia de nitrógeno y azufre, se debe a la bioconjugación de los AuNRs con Ker, toda vez que la queratina contiene ácido glutámico (HOOC-CH (NH₂) - (CH₂)₂-COOH), lisina (H₂N(CH₂)₄CH(NH₂)CO₂H), ácido aspártico (HO₂ CCH(NH₂) CH₂ CO₂ H), H-N=(NHR)NH₂ y HS-CH₂-CHNH₂-COOH en sus cadenas polipeptídica ácida y básica. Es precisamente la presencia del puente disulfuro de la cistina, lo que permite la formación de los enlaces tioles con el oro de los AuNRs. Nos referimos a AuNRs-Ker/As₂, como la muestra de AuNRs bioconjugados con queratina y expuestos a una solución en concentración de 2 µg/L, mientras que AuNRs-Ker/As₁₀ y AuNRs-Ker/As₅₀ corresponden a concentraciones del

arsenito de 10 y 50 $\mu\text{g/L}$, respectivamente.

Se determinó que los elementos con mayor concentración atómica son el carbono y el oxígeno, y los de menor concentración son el arsénico y el azufre. En el caso del arsénico, la concentración porcentual atómica aumenta con la concentración de arsenito presente en las disoluciones empleadas. Es decir, los AuNRs bioconjugados y expuestos a diferentes concentraciones de arsenito, funcionan como sensores de analito de interés (As^{3+}).

Tabla 3.7. Concentración atómica de los elementos: carbono, nitrógeno, oxígeno, azufre, oro y arsénico en las muestras.

Elemento	Muestra (Concentración atómica, %)				
	AuNRs	AuNRs+Ker	AuNRs+Ker+As2	AuNRs+Ker+As10	AuNRs+Ker+As50
C (1s)	69.35	34.78	19.47	35.75	41.87
N (1s)	5.52	7.40	5.11	8.67	7.77
O (1s)	12.38	53.02	73.87	53.72	46.17
S (2p)	0.34	1.05	0.80	0.52	0.54
Au (4f)	12.39	3.73	0.41	0.92	3.22
As (3d)	0	0	0.31	0.39	0.40

Ambiente químico

En esta sección se presentan los espectros a detalle de las muestras analizadas: nanorods de oro (AuNRs), nanorods de oro bioconjugados con queratina (AuNRs-Ker), nanorods de oro bioconjugados con queratina y en interacción con arsenito a 2 $\mu\text{g/L}$ (AuNRs-Ker/As2), nanorods de oro bioconjugados con queratina y en interacción con arsenito a 10 $\mu\text{g/L}$ (AuNRs-Ker/As10), y nanorods de oro bioconjugados con queratina y en interacción con arsenito a 50 $\mu\text{g/L}$ (AuNRs-Ker/As50).

En todas las muestras, observamos un pico en 284 eV asociado a enlaces C-C y C-H. La primera fuente de carbono es la residual y trazas del CTAB empleado estabilizar a los nanorods de oro durante su síntesis. La intensidad de este pico es más pronunciada en las muestras de nanorods de oro no modificados (AuNRs), lo que sugiere que la presencia de CTAB es más predominante en esta muestra. Además del CTAB, otros compuestos orgánicos presentes en las muestras, como la queratina empleada durante la bioconjugación, dadas su estructura de doble cadena con la presencia de muchos carbonos. Alrededor de 286 eV se presenta otro pico que se asoció con enlaces C-O, posiblemente relacionados con grupos oxigenados. La intensidad de este pico varía con la concentración de arsenito, lo que sugiere una posible interacción con el entorno. En 287 eV, se presentó un pico solo en aquellas muestras bioconjugadas y/o expuestas a arsenito. Ésta, se asocia con enlaces C-N o C-S del ácido

glutámico ($\text{HOOC-CH}(\text{NH}_2) - (\text{CH}_2)_2\text{-COOH}$), lisina ($\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$), ácido aspártico ($\text{HO}_2\text{CCH}(\text{NH}_2) - \text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$), $\text{H-N}=(\text{NHR})\text{NH}_2$ y $\text{HS-CH}_2\text{-CHNH}_2\text{-COOH}$ en sus cadenas polipeptídica ácida y básica, como se mencionó previamente [51]. Las diferencias en la intensidad de los picos de carbono entre las muestras indican una mayor contribución de compuestos orgánicos en la superficie.

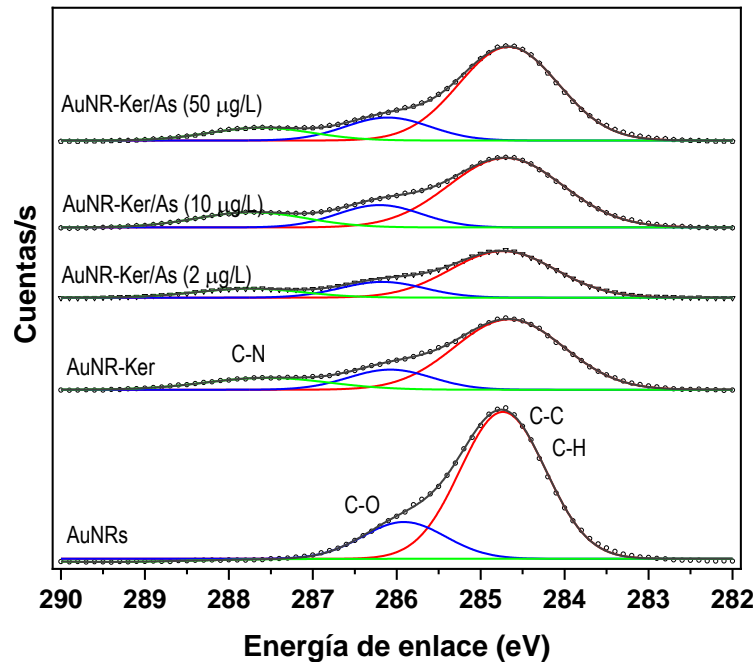


Figura 3.17. Espectros de XPS de alta resolución de C(1s).

La intensidad de este pico varía con la concentración de arsenito, lo que sugiere una posible interacción con el entorno. En 287 eV, se presentó un pico solo en aquellas muestras bioconjugadas y/o expuestas a arsenito. Ésta, se asocia con enlaces C-N o C-S del ácido glutámico ($\text{HOOC-CH}(\text{NH}_2) - (\text{CH}_2)_2\text{-COOH}$), lisina ($\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$), ácido aspártico ($\text{HO}_2\text{CCH}(\text{NH}_2) - \text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$), $\text{H-N}=(\text{NHR})\text{NH}_2$ y $\text{HS-CH}_2\text{-CHNH}_2\text{-COOH}$ en sus cadenas polipeptídica ácida y básica, como se mencionó previamente [51]. Las diferencias en la intensidad de los picos de carbono entre las muestras indican una mayor contribución de compuestos orgánicos en la superficie.

En el caso de los espectros a detalle del oxígeno (**Figura 3.18**), en la muestra AuNR, se presenta un único pico alrededor en 532 eV, asociado a O(1s). El resto de las muestras presentaron este pico corrido menores energía de enlace, que sugiere la formación de enlaces oxígeno-oro (O-Au), que pueden ser indicativos de la presencia de grupos funcionales oxigenados en la superficie de los nanorods o de compuestos adsorbidos que contienen oxígeno. También en el resto de las muestras se

determinó un pico en 530 eV que se asocia a enlaces oxígeno-carbono (O-C) o enlaces oxígeno-sulfuro (O-S) [52]. La presencia de este pico indica la existencia de compuestos orgánicos superficiales o compuestos que contienen azufre adsorbidos en la superficie de los nanorods, relacionados con la bioconjugación con queratina y las interacciones con arsenito en las muestras empleadas como nanosensores coloidales.

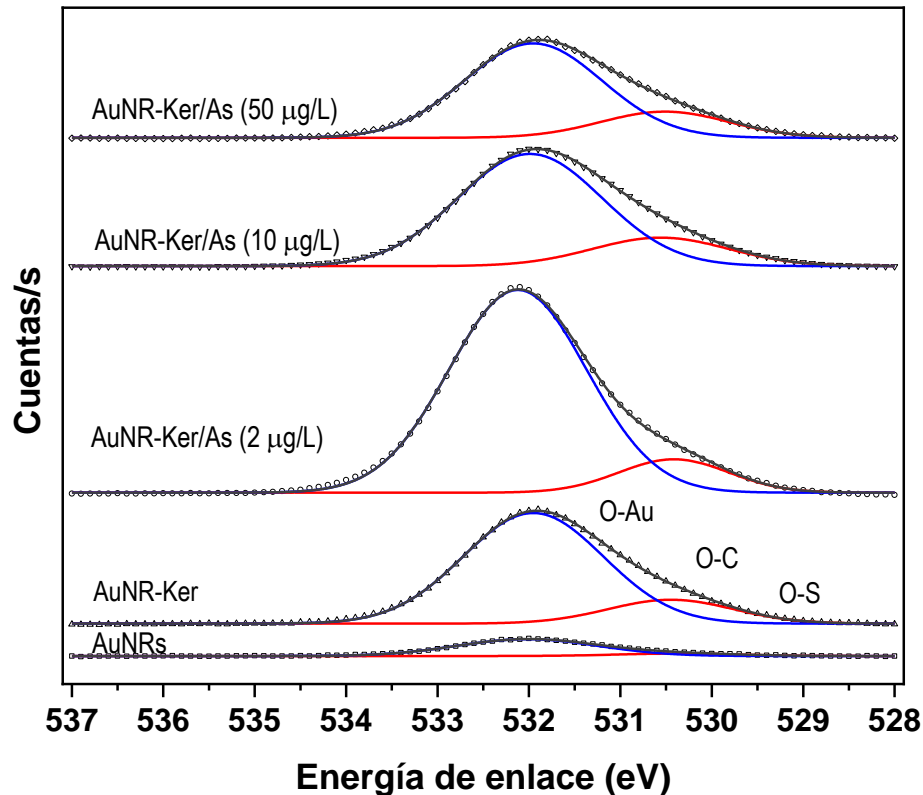


Figura 3.18. Espectros de XPS de alta resolución de O(1s).

Los espectros a detalle del oro se presentan en la **Figura 3.19**. La posición y el desplazamiento de los valores de energía de enlace de los niveles centrales $Au4f_{7/2}$ y $Au4f_{5/2}$, corresponden a la presencia de diferentes estados químicos del oro y sus estados oxidativos, predominando el estado de oxidación cero (Au^0), que está en acuerdo con lo reportado en la literatura [53]. En un estudio previo realizado por Nivedita Priyadarshni y colaboradores [3], identificaron estos dos picos característicos y los asociaron al estado de oxidación cero del oro antes de hacer la deconvolución.

En la **Figura 3.20** se presentan los espectros a detalle del azufre, la presencia de un pico en la región de energía de 163 eV se asocia con enlaces S-H, derivados de los grupos tioles (-SH) de la queratina. Los grupos tioles son conocidos por su fuerte afinidad hacia la superficie de metales nobles como el oro. La detección de este pico sugiere que los grupos tioles pueden estar presentes en la superficie de los nanorods de oro bioconjugados y/o expuestos a arsenito. El pico de azufre en la

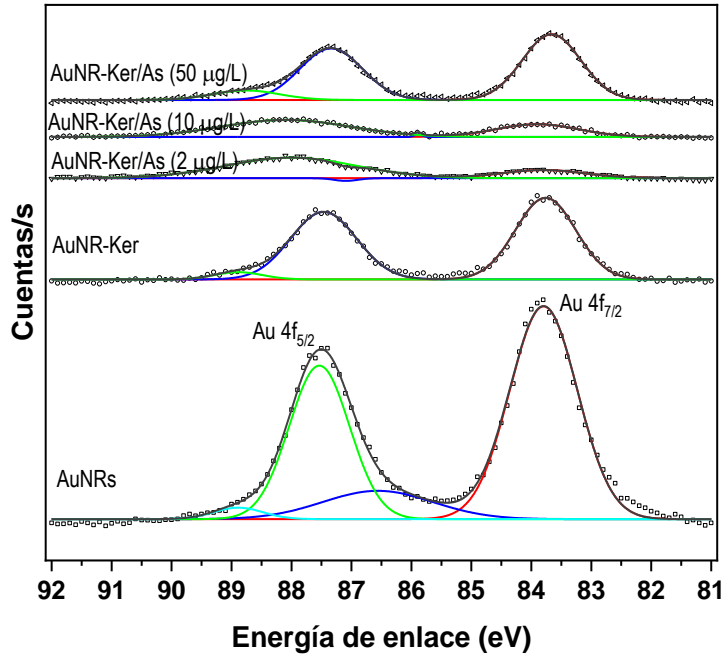


Figura 3.19. Espectros de XPS de alta resolución de Au(4f).

región de energía de 168 eV se asocia a enlaces S-S, que indican la presencia de grupos disulfuro (-SS-), que pueden formarse a partir de la oxidación de grupos tioles (-SH) en la superficie de los nanorods [54]. Así mismo, esta oxidación puede estar relacionada con la interacción con arsenito.

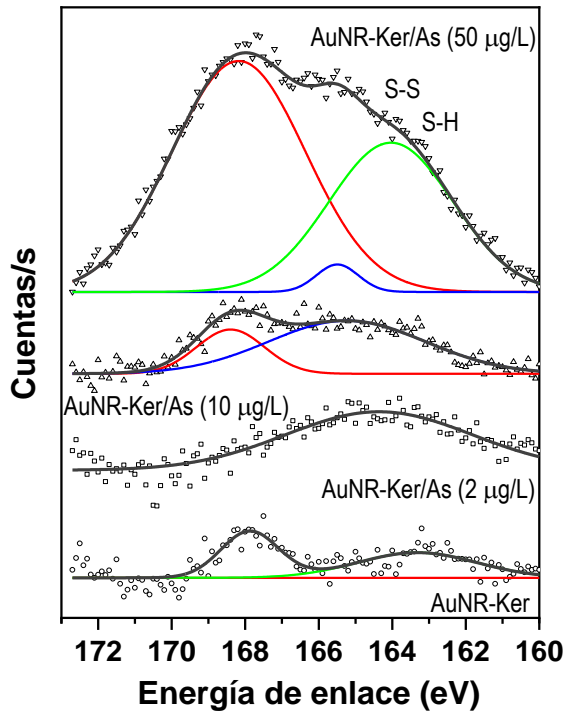


Figura 3.20. Espectros de XPS de alta resolución de S(2p).

La detección de un pico de arsénico (**Figura 3.21**), en la región de energía de 43 eV indica la presencia de arsénico en estados de oxidación relativamente bajos, posiblemente asociados con As^{3+} en As_2O_3 [55]. Este hallazgo sugiere que el arsénico está presente en la superficie de los nanorods en una forma que conserva su estado de oxidación trivalente.

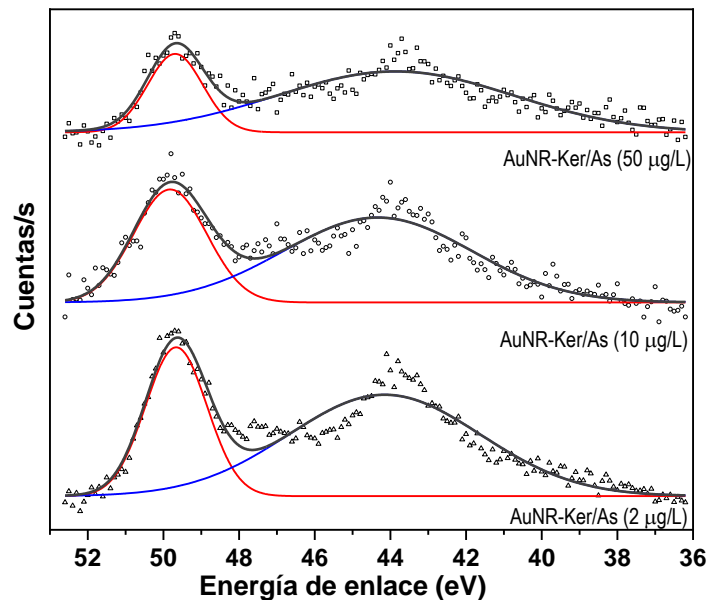


Figura 3.21. Espectros de XPS de alta resolución de As(3d).

2.2 Diseño y fabricación de dispositivos microfluídicos en papel (μPADs)

Como se mencionó previamente, el uso de papel para el diseño de dispositivos microfluídicos reduce el costo dado que aprovecha la estructura del papel para la conducción por capilaridad, en las fibras, de un solvente de interés. La **Figura 3.22** corresponde a micrografías por microscopía electrónica de barrido (SEM, *scanning electron microscopy*) del papel empleado en la fabricación de los dispositivos μPADs .

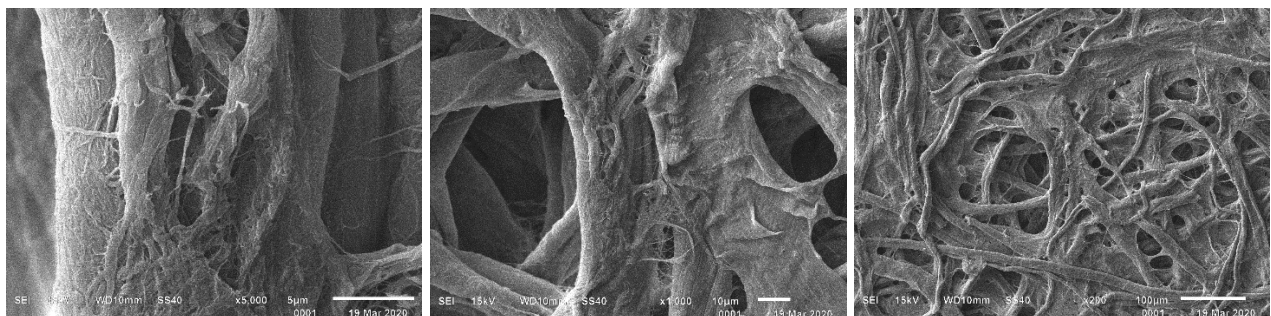


Figura 3.22. Micrografías SEM de papel Whatman No. 1, empleado en la fabricación de los μPADs , en diferentes ampliaciones. Espesor papel 180 μm , peso base 87 g/m^2 .

El interés del empleo de celulosa radica en su abundancia en la naturaleza (es el polímero más abundante), su reciclaje y la explotación de las microfibras y nanofibrillas que componen su estructura, las cuales le confieren la capacidad de sustituir las bombas de los tradicionales sistemas microfluídicos [56].

Con el software ImageJ se obtuvieron los diámetros de los poros del papel, así como el diámetro de las fibras como se muestra en la **Figura 3.23**.

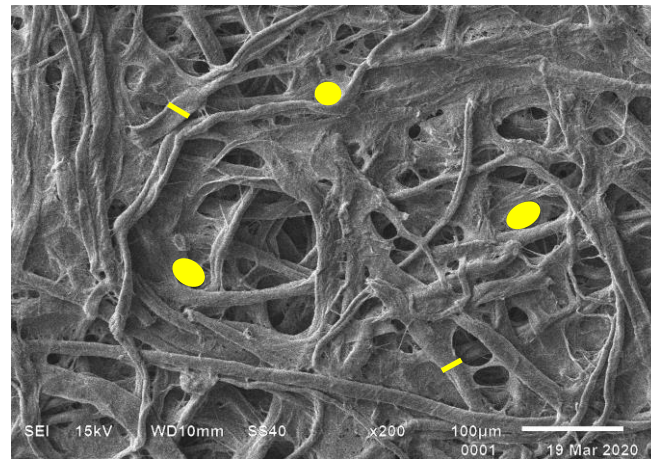


Figura 3.23. Determinación de los diámetros de los poros y fibras.

Los resultados de los diámetros se muestran en los histogramas de la **Figura 3.24**, para las 50 fibras que se midieron se obtuvo un promedio de $20.53 \mu\text{m} \pm 9.36 \mu\text{m}$, y para los 20 poros se obtuvo un promedio de $9.88 \mu\text{m} \pm 6.04 \mu\text{m}$.

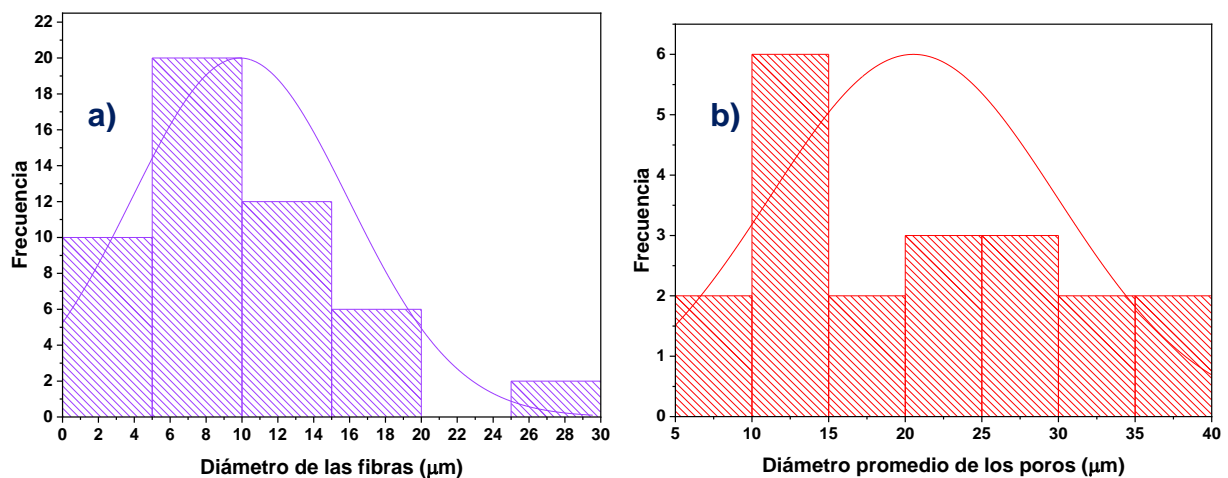


Figura 3.24. a) Histograma de frecuencias de la distribución del diámetro de las fibras del papel Whatman 1. b) Histograma de frecuencias de la distribución del diámetro promedio de los poros del papel Whatman 1.

El diseño del dispositivo seleccionado fue dibujado en AutoCad 2022 y consiste en una configuración con 6 canales radiales, con la zona de inyección (ZI) en el centro y las 6 zonas de sensado (ZS) en los extremos (**Figura 3.25**). Los parámetros variados incluyeron: el ancho de barrera, ancho de canal, largo del canal y color.

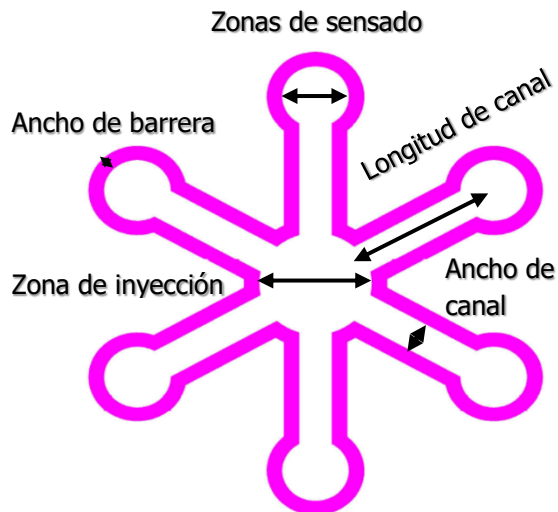










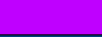



Figura 3.25. Diseño del μ PAD con 6 canales radiales, zona de inyección (ZI) en el centro y 6 zonas de sensado (ZS) en los extremos.

Se variaron colores de impresión del μ PAD, con el objetivo de seleccionar aquellos que sirvieran como barreras hidrofóbicas que impidieran filtraciones. Los colores empleados para imprimir los μ PAD se muestran en la **Tabla 3.8**. Una vez impresos, se realizaron pruebas de inyección y evaluación de filtración de fluidos en los dispositivos fabricados.

En la **Figura 3.26** se ejemplifican la impresión con resina de μ PADs con ancho de canal de 3 mm, diámetro en zona de la zona de sensado de 6 mm, diámetro de la zona de inyección de 12 mm y longitud de canal de 14.5 mm. La **Figura 3.26a** corresponde a los μ PADs impresos en cuatro colores, **Figura 3.26b** son los μ PADs después de tratamiento térmico a $T = 166\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tabla 3.8. Código de colores para la impresión de μ PADs en códigos RGB y CMYK.

Índice de color	Color en RGB (rojo, verde y azul)	CMYK (cian, magenta, amarillo y negro)	Color
220	(255,0,124)	(0, 1, 0.251, 0)	
222	(165,0,124)	(0, 1, 0.248, 0.353)	
240	(255, 0, 63)	(0, 1, 0.753, 0)	
54	(127, 127, 0)	(0, 0, 1, 0.502)	
11	(255, 127, 127)	(0, 0.502, 0.502, 0)	
122	(0, 165, 124)	(1, 0, 0.248, 0.353)	
230	(255, 0, 127)	(0, 1, 0.502, 0)	
20	(255, 63, 0)	(0, 0.753, 1, 0)	
13	(165, 82, 82)	(0, 0.503, 0.503, 0.353)	
102	(0, 165, 41)	(1, 0, 0,752, 0.353)	
200	(191, 0, 255)	(0.251, 1, 0, 0)	
154	(0, 63, 127)	(1, 0.504, 0, 0.502)	

En la **Tabla 3.9** se presentan los resultados de la variación de los parámetros en la impresión de los μ PADs iniciales en función del color de la tinta. En general, se observa un aumento significativo del ancho de la barrera en un 60%, después de aplicar el tratamiento térmico. Este incremento se debe a la impregnación de la cera en el papel, lo que provoca una expansión de la barrera. Como consecuencia, el ancho del canal se vuelve más estrecho.

Tras la fabricación de los μ PADs, se llevaron a cabo pruebas de inyección de fluidos para evaluar su hidrofobicidad. Los resultados revelaron que el único μ PAD que presentó fugas tenía una composición de colores CMYK (0, 0.502, 0.502, 0), donde la tinta magenta y la tinta amarilla estaban presentes en proporciones iguales. Potter, Brisk y Grover [57], reportaron que la superficie del papel impregnada con tinta de cera amarilla podría ser menos hidrofóbica en comparación con los otros colores. Todas las demás combinaciones de colores no mostraron fugas durante las pruebas.

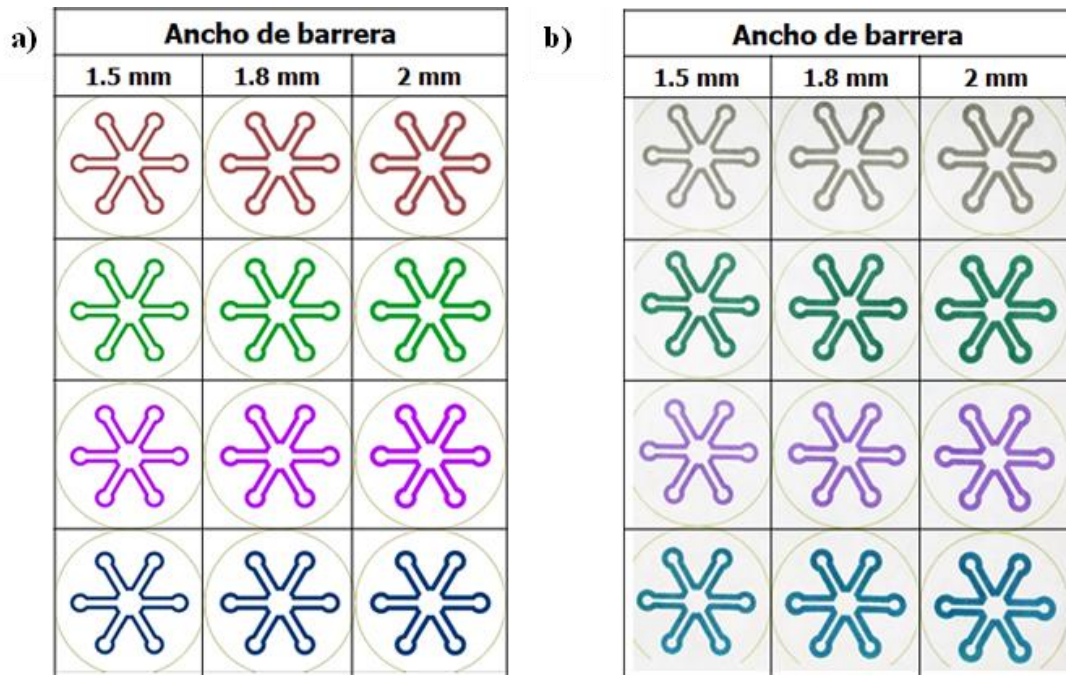


Figura 3.26. μ PADs con ancho de canal de 3 mm, diámetro en zona de la zona de sensado de 6 mm, diámetro de la zona de inyección de 12 mm y longitud de canal de 14.5 mm. a) impresiones en cuatro colores, b) μ PADs después de tratamiento térmico a $T = 166\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tabla 3.9. Variación de parámetros en el primer experimento antes y después del tratamiento térmico.

Antes del tratamiento térmico												
Parámetro	Ancho de barrera (mm)		Ancho de canal (mm)		Diámetro de la ZS (mm)		Diámetro de la ZI (mm)		Longitud del canal (mm)			
	1.5, 1.8, 2		3		6		12		14.5			
Color	Ancho de barrera: 1.5 mm			Ancho de barrera: 1.8 mm				Ancho de barrera: 2 mm				
Después del tratamiento térmico ($T=166\text{ }^{\circ}\text{C}$)												
Color	Ancho de barrera (mm)	Ancho de canal (mm)	Diámetro de ZS (mm)	Diámetro de ZI (mm)	Ancho de barrera (mm)	Ancho de canal (mm)	Diámetro de ZS (mm)	Diámetro de ZI (mm)	Ancho de barrera (mm)	Ancho de canal (mm)	Diámetro de ZS (mm)	Diámetro de ZI (mm)
	2.5	1.6	4	10	3	1.6	4	10	3.2	1.6	4	10
	2.7	1.6	3.5	10	3	1.6	3.5	10	3.2	1.6	3.5	10
	2.8	1.2	3.6	10	3	1.2	3.6	10	3.2	1.2	3.6	10
	2.6	1.4	5	10	3	1.4	5	10	3.2	1.4	5	10
	2.2	2.2	4	10	2.4	2.2	4	10	2.6	2.2	4	10
	2.8	1.5	3.7	10	3	1.5	3.7	10	3.2	1.5	3.7	10
	2.9	1.6	3.9	10	3.1	1.6	3.9	10	3.3	1.6	3.9	10
	2.5	1.5	3.8	10	2.8	1.5	3.8	10	3.2	1.5	3.8	10
	2.6	1.8	4.2	10	2.8	1.8	4.2	10	3.2	1.8	4.2	10
	2.9	1.3	3.5	10	3.1	1.3	3.5	10	3.5	1.3	3.5	10
	2.1	1.9	3.8	10	2.4	1.9	3.8	10	2.6	1.9	3.8	10
	2.9	1.6	3.9	10	3.2	1.6	3.9	10	3.4	1.6	3.9	10

Con el objetivo de reducir el tamaño de los dispositivos y de emplear menos tinta en su fabricación, se diseñaron e imprimieron μ PADs variando el ancho de barrera antes del tratamiento térmico, la longitud de canal y el ancho de canal. La **Tabla 3.10** resume los experimentos realizados en esta segunda etapa.

Tabla 3.10. Variación de parámetros en el primer experimento antes y después del tratamiento térmico.

Variables		
Ancho de barrera antes del tratamiento térmico (mm)	Longitud de canal (mm)	Ancho de canal (mm)
0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3	3	2, 2.2, 2.4, 2.6, 2.8, 3

En respuesta a los resultados del experimento anterior, se logró reducir significativamente el ancho de la barrera de 1.5 mm a 0.1 mm, lo que representa una reducción del 93.3 %. En este experimento se optó por no utilizar la tinta que presentó fallas en el caso anterior. La **Figura 3.27** ejemplifica los μ PADs fabricados.

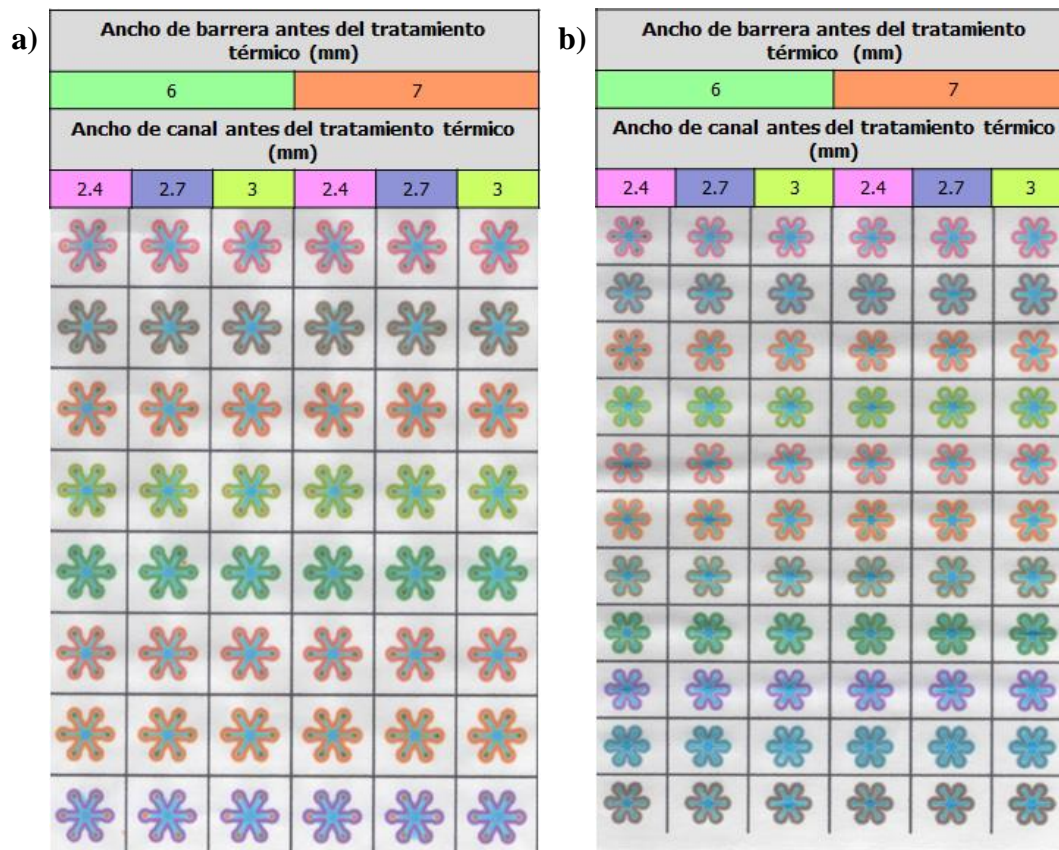


Figura 3.27. μ PADs con diámetro de ZS de 6mm, diámetro de ZI de 12 mm y longitud de canal de a)7 mm y b) 4.8 mm, después de tratamiento térmico a T = 166 °C.

Así mismo, se sometieron los μ PADs a tratamiento térmico y se llevaron a cabo pruebas de inyección de fluidos (**Figura 3.24**). Se observó que ninguno de los dispositivos presentó fallas durante las pruebas de inyección. La **Figura 3.28** ejemplifica las réplicas de μ PADs en una sola tinta de cera elegida.

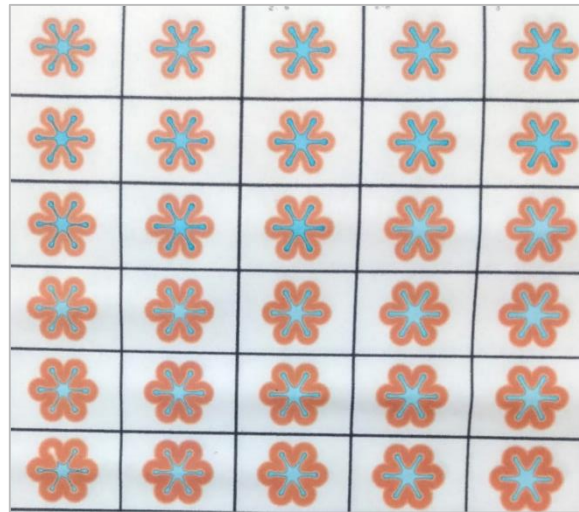


Figura 3.28. Réplicas y prueba de inyección de μ PADs en un solo color de cera.

Entonces, la reducción del ancho de la barrera y la eliminación de las fugas demuestra un avance significativo en la mejora de la hidrofobicidad de los μ PADs, lo cual es esencial para su funcionalidad y aplicaciones futuras.

2.3 Lectura de soluciones de tinte vegetal empleando un sistema de lectura colorimétrico experimental

Se utilizó el dispositivo experimental de lectura colorimétrica (**Figura 3.29**), desarrollado para conocer la factibilidad de su empleo como lector del papel Whatman tipo 1, con el cual fueron fabricados los μ PADs fabricados.

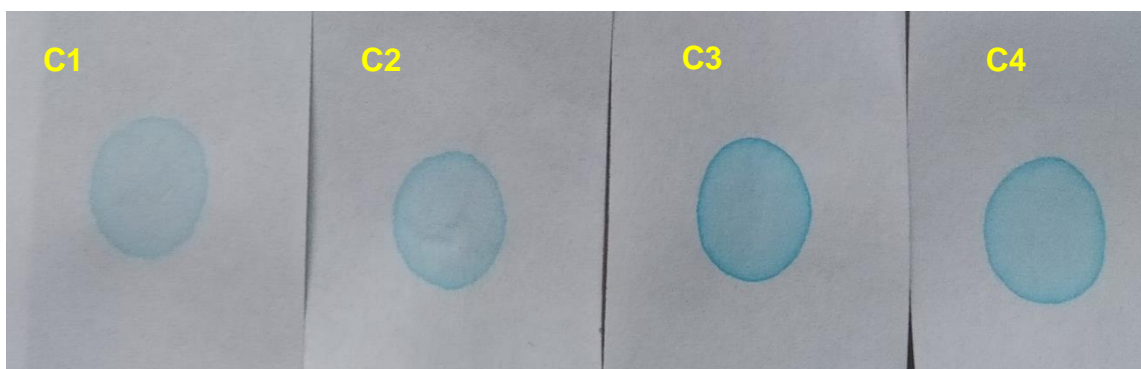


Figura 3.29. Pruebas de inyección de agua/colorante a distintas relaciones: C1 (10%), C2 (20%), C3 (40%) y C4 (50%).

Se empleó colorante vegetal azul en agua en relaciones 10, 20, 40 y 50 % v/v, que se rotularon como experimentos C1, C2, C3 y C4, respectivamente. Alícuotas de 10 μ L de disolución se depositaron sobre papel filtro tipo Whatman 1 (**Figura 3.29**) y se realizó su lectura con el dispositivo.

Los valores RGB obtenidos se presentan en la **Tabla 3.11** con un promedio y desviación estándar para cada muestra, habiéndose realizado seis repeticiones para cada concentración empleada.

Tabla 3.11. Valores RGB obtenidos con el dispositivo de lectura colorimétrica experimental.

Color	Disolución			
	C1	C2	C3	C4
Rojo	152.37 \pm 0.46	154.12 \pm 0.48	149.14 \pm 0.77	136.76 \pm 0.42
Verde	162.15 \pm 0.20	161.09 \pm 0.58	163.85 \pm 0.73	167.71 \pm 0.41
Azul	152.97 \pm 0.37	153.06 \pm 0.21	155.84 \pm 0.12	157.47 \pm 0.74

En la **Figura 3.30** se presenta una gráfica que muestra los valores RGB correspondientes a las mediciones de color obtenidas por un sensor RGB con su respectiva desviación estándar en cuatro muestras diferentes. Para evaluar si este sensor es capaz de distinguir tonalidades distintas de color, aplicamos el método de Tukey, una herramienta estadística ampliamente reconocida para comparar grupos en un conjunto de datos y determinar si existen diferencias significativas entre ellos.

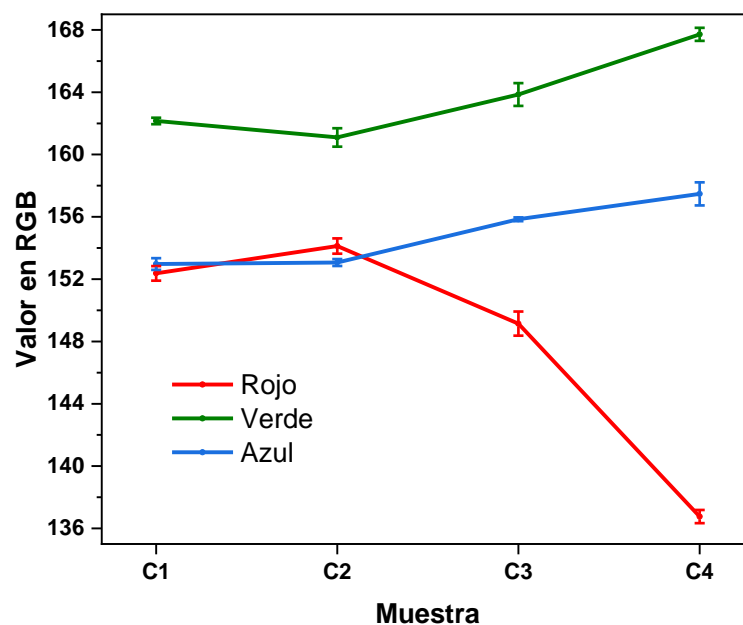


Figura 3.30. Valores RGB para cada muestra: C1 (10%), C2 (20%), C3 (40%) y C4 (50%).

El propósito principal de la aplicación del método de Tukey fue identificar diferencias significativas entre las medias de las muestras. Esto nos permitió determinar si los grupos de muestras eran estadísticamente distintos entre sí. Los resultados del análisis indican que las medias se agruparon de manera diferente, lo que implica que son significativamente diferentes entre sí. Sin embargo, aún estamos trabajando en mejorar la sensibilidad del sensor. Esta es una primera prueba de que el lector puede detectar ligeras variaciones de color sobre papel Whatman tipo 1.

En resumen, en este trabajo de tesis se fabricaron exitosamente nanosensores de oro selectivos a concentraciones de arsenito, en soluciones coloidales. El estudio mediante microscopia electrónica de transmisión y espectroscopia UV-Vis indicó que las estructuras de oro fabricadas por mediación de semillas tuvieron una razón de aspecto de 2-3, un factor de calidad cercano a 10 y una morfología de nanovarilla. Las espectroscopias UV-Vis y XPS permitieron determinar que las nanovarillas de oro bioconjugadas con queratina son selectivas a concentraciones de arsenito en un rango de 2 a 50 $\mu\text{g/L}$. Así mismo, se diseñaron y fabricaron sistemas microfluídicos sobre papel Whatman tipo 1, con zona de sensado e inyección de inyección, en forma de estrella de 6 picos. Las pruebas de inyección sobre las impresiones de los sensores fabricados indican que la técnica de impresión por cera combinada con un tratamiento térmico, son una buena opción para su fabricación, dado que permiten la eliminación de fugas y una disminución en el ancho de barrera de hasta 0.1 mm y longitud de canal de 3 mm en todos los colores empleados, salvo en la combinación CMYK (0, 0.502, 0.502, 0). Finalmente, se probó que es factible la lectura de soluciones colorante sobre papel Whatman tipo 1, empleando un sistema lector colorimétrico experimental. Sin embargo, son necesarias más pruebas para su corroboración fehaciente.

Conclusiones

Se estableció un protocolo de síntesis de nanovarillas de oro (AuNRs) por el método mediado por semillas. Las bandas plasmónicas localizadas LSPR transversal y longitudinal de los coloides de AuNRs, fueron determinadas en ~522 y ~653 nm, para una razón de aspecto ~2.4 y su factor de calidad cercano a 10.

Se estableció un protocolo de disolución de queratina comercial para su uso en la bioconjugación de los nanorods de oro previamente fabricados (AuNRs).

Se estableció un protocolo para la bioconjugación de los AuNRs con queratina comercial purificada.

Se determinó que la absorbancia, concentración elemental porcentual y ambiente químico cambian en muestras de coloides de nanorods de oro bioconjugados con queratina expuestos a distintas concentraciones de As^{3+} (2, 4, 6, 8 y 50 $\mu\text{g/L}$). Entonces, pueden ser empleados como nanosensores de arsenito. El fenómeno de la resonancia de plasmones de superficie localizados en los nanorods de oro se ve afectado por la bioconjugación con queratina y la interacción con los iones de As^{3+} lo que provoca cambios en la tonalidad de los coloides y la absorbancia de las bandas de absorción. Estos cambios son indicativos de la presencia y la interacción de los iones de As^{3+} en el sistema, lo que permite su detección.

Se diseñaron y fabricaron μPADs impresos con cera sobre papel Whatman tipo 1, con zona de sensado e inyección de inyección, en forma de estrella de 6 picos.

Las pruebas de inyección sobre las impresiones de los sensores fabricados indican que la técnica de impresión por cera combinada con un tratamiento térmico, son una buena opción para su fabricación, dado que permiten la eliminación de fugas y una disminución en el ancho de barrera de hasta 0.1 mm y longitud de canal de 3 mm, en todos los colores empleados, salvo en la combinación CMYK (0, 0.502, 0.502, 0).

Se estableció la prueba de concepto del uso de un dispositivo experimental de lectura colorimétrica, a diferentes concentraciones de colorante vegetal azul absorbidas sobre papel tipo Whatman 1.

Referencias

- [1] T. M. Ansari, I. L. Marr, and N. Tariq, "Heavy Metals in Marine Pollution Perspective—A Mini Review," *J. Appl. Sci.*, vol. 4, no. 1, pp. 1–20, Dec. 2003, doi: 10.3923/JAS.2004.1.20.
- [2] P. B. Tchounwou, C. G. Yedjou, A. K. Patlolla, and D. J. Sutton, "Heavy Metals Toxicity and the Environment," *EXS*, vol. 101, p. 133, 2012, doi: 10.1007/978-3-7643-8340-4_6.
- [3] N. Priyadarshni, P. Nath, Nagahanumaiah, and N. Chanda, "DMSA-Functionalized Gold Nanorod on Paper for Colorimetric Detection and Estimation of Arsenic (III and V) Contamination in Groundwater," *ACS Sustain. Chem. Eng.*, vol. 6, no. 5, pp. 6264–6272, 2018, doi: 10.1021/acssuschemeng.8b00068.
- [4] K. J. Reddy, K. J. McDonald, and H. King, "A novel arsenic removal process for water using cupric oxide nanoparticles," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 397, pp. 96–102, 2013, doi: 10.1016/j.jcis.2013.01.041.
- [5] "Arsenic," 2018. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/arsenic> (accessed Apr. 19, 2022).
- [6] P. L. A.-K. Smedley D.G., "A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters RN - Appl. Geochem., vol. 17, pp. 517-568," *Appl. Geochemistry*, vol. 17, pp. 517–568, 2002.
- [7] N. C. Peuli Nath, Ravi Kumar Arun, "A paper based microfluidic device for the detection of arsenic using gold nanosensor Peuli," *R. Soc. Chem.*, 2014, doi: 10.1039/b000000x.
- [8] Anushka, A. Bandopadhyay, and P. K. Das, "Paper based microfluidic devices: a review of fabrication techniques and applications," *Eur. Phys. J. Spec. Top.*, vol. 232, no. 6, pp. 781–815, 2023, doi: 10.1140/epjs/s11734-022-00727-y.
- [9] Y. Lin, D. Gritsenko, S. Feng, Y. C. Teh, X. Lu, and J. Xu, "Detection of heavy metal by paper-based microfluidics," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 83, pp. 256–266, Sep. 2016, doi: 10.1016/J.BIOS.2016.04.061.
- [10] G. G. Morbioli, T. Mazzu-Nascimento, A. M. Stockton, and E. Carrilho, "Technical aspects and challenges of colorimetric detection with microfluidic paper-based analytical devices (μ PADs) - A review," *Anal. Chim. Acta*, vol. 970, pp. 1–22, 2017, doi: 10.1016/j.aca.2017.03.037.
- [11] K. Ge, J. Liu, G. Fang, P. Wang, D. Zhang, and S. Wang, "A colorimetric probe based on functionalized gold nanorods for sensitive and selective detection of as(III) ions," *Sensors (Switzerland)*, vol. 18, no. 7, pp. 1–13, 2018, doi: 10.3390/s18072372.
- [12] R. Domínguez-González, L. González Varela, and P. Bermejo-Barrera, "Functionalized gold nanoparticles for the detection of arsenic in water," *Talanta*, vol. 118, pp. 262–269, 2014. doi: 10.1016/j.talanta.2013.10.029.
- [13] B. Sahu, R. Kurrey, M. K. Deb, K. Shrivastava, I. Karbhal, and B. R. Khalkho, "A simple and cost-effective paper-based and colorimetric dual-mode detection of arsenic(iii) and lead(ii) based on glucose-functionalized gold nanoparticles," *RSC Adv.*, vol. 11, no. 34, pp. 20769–20780, 2021, doi: 10.1039/d1ra02929k.
- [14] A. Rajput, G. Shevalkar, K. Pardeshi, and P. Pingale, "Computational nanoscience and technology," *OpenNano*, vol. 12, no. November 2022, p. 100147, 2023, doi: 10.1016/j.onano.2023.100147.
- [15] L. Dykman and N. Khlebtsov, "Gold nanoparticles in biomedical applications: Recent advances and perspectives," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 41, no. 6, pp. 2256–2282, 2012, doi: 10.1039/c1cs15166e.
- [16] J. E. Hull, S. C. Sahu, and A. W. Hayes, "Nanotechnology: History and future," *Hum. Exp.*

- Toxicol.*, vol. 34, no. 12, pp. 1318–1321, 2015, doi: 10.1177/0960327115603588.
- [17] M. Rafique, M. B. Tahir, M. S. Rafique, and M. Hamza, “History and fundamentals of nanoscience and nanotechnology,” in *Nanotechnology and Photocatalysis for Environmental Applications*, Elsevier Inc., 2020, pp. 1–25. doi: 10.1016/b978-0-12-821192-2.00001-2.
- [18] C. P. Devatha and A. K. Thalla, “Green Synthesis of Nanomaterials,” in *Synthesis of Inorganic Nanomaterials: Advances and Key Technologies*, Elsevier Ltd., 2018, pp. 169–184. doi: 10.1016/B978-0-08-101975-7.00007-5.
- [19] M. Rafique, M. B. Tahir, M. S. Rafique, N. Safdar, and R. Tahir, “Nanostructure materials and their classification by dimensionality,” in *Nanotechnology and Photocatalysis for Environmental Applications*, Elsevier Inc., 2020, pp. 27–44. doi: 10.1016/b978-0-12-821192-2.00002-4.
- [20] J. Parascandola, *King of Poisons A history of Arsenic*, First Edit. Potomac Books, 2012.
- [21] J. C. States, *Exposure Sources, Health Risks, and Mechanisms of Toxicity*. Louisville; KY, USA: Wiley, 2016.
- [22] S. Ahuja, *Arsenic contamination of Groundwater*. Wiley, 2008. [Online]. Available: e:%5CIIHLLA%5CPROYECTO ARSENICO%5CBibliografia As%5CReferencias_as%5CLibros%5CARS?nico Ahuja.pdf
- [23] J. Berthier, K. A. Brakke, and E. Berthier, *Open microfluidic*. Scrivener Publishing, 2016.
- [24] “Paper microfluidic devices : A review 2017 - Elveflow.” <https://www.elveflow.com/microfluidic-reviews/general-microfluidics/paper-microfluidic-devices-a-review-2017/> (accessed Feb. 20, 2022).
- [25] Y. Lin, D. Gritsenko, S. Feng, Y. Chen, X. Lu, and J. Xu, “Detection of heavy metal by paper-based microfluidics,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 83, pp. 256–266, 2016, [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2016.04.061>
- [26] T. Owen, *Principios y aplicaciones de espectroscopía Uv-Visible*. 2000. doi: 10.1007/s13398-014-0173-7.2.
- [27] C. S. S. R. Kumar, *UV-VIS and photoluminescence spectroscopy for nanomaterials characterization*. 2013. doi: 10.1007/978-3-642-27594-4.
- [28] D. A. Skoog, F. J. Holler, and S. R. Crouch, *Principles of Instrumental Analysis*, Sixth Edit. David Harris, 2007. doi: 10.1016/s0003-2670(00)84936-3.
- [29] D. N. G. Krishna and J. Philip, “Review on surface-characterization applications of X-ray photoelectron spectroscopy (XPS): Recent developments and challenges,” *Appl. Surf. Sci. Adv.*, vol. 12, no. June, p. 100332, 2022, doi: 10.1016/j.apsadv.2022.100332.
- [30] M. Faraldos and C. Goberna, *Técnicas de análisis y caracterización de materiales*, Segunda ed. Madrid, 2011. [Online]. Available: http://libros.csic.es/product_info.php?products_id=498
- [31] J. C. Vickerman and I. S. Gilmore, *Surface Analysis - The Principal Techniques*. 2009. doi: 10.1002/9780470721582.
- [32] “Espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS).” <https://steemit.com/stem-espanol/@carloserp-2000/espectroscopia-fotoelectronica-de-rayos-x-xps>
- [33] L. Reimer and H. Kohl, *Transmission Electron Microscopy*, vol. 53, no. 9. 2019. doi: 10.1007/978-0-387-34758-5.
- [34] P. Fernández, “Partes del microscopio electrónico.” <https://www.microscopioelectronico.top/partes-del-microscopio-electronico/>
- [35] M. Z. Wei, T. S. Deng, Q. Zhang, Z. Cheng, and S. Li, “Seed-Mediated Synthesis of Gold Nanorods at Low Concentrations of CTAB,” *ACS Omega*, vol. 6, no. 13, pp. 9188–9195, 2021, doi: 10.1021/acsomega.1c00510.
- [36] “Gold(III) Chloride Trihydrate | AMERICAN ELEMENTS ®.”

- <https://www.americanelements.com/gold-iii-chloride-trihydrate-16961-25-4> (accessed Oct. 12, 2020).
- [37] S. Pouya, M. Kazemi, S. Pouya, A. Dehshahri, and Z. Sobhani, "Evaluation of CTAB coated gold nanoparticles as a potential carrier for gene delivery," *Trends Pharm. Sci.*, vol. 2022, no. 3, p. 8, doi: 10.30476/TIPS.2022.95505.1146.
- [38] "Sodium borohydride | NaBH₄ - PubChem." <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sodium-borohydride> (accessed Nov. 22, 2022).
- [39] "Ascorbic Acid | HC₆H₇O₆ - PubChem." <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ascorbic-Acid> (accessed Nov. 22, 2022).
- [40] Thermo Scientific, "Guía de Usuario del NanoDrop," *Espectrofotómetros micro-UV/Vis NanoDrop*, pp. 1–342, 2016, [Online]. Available: www.thermoscientific.com/nanodrop
- [41] B. Wang, W. Yang, J. McKittrick, and M. A. Meyers, "Keratin: Structure, mechanical properties, occurrence in biological organisms, and efforts at bioinspiration," *Prog. Mater. Sci.*, vol. 76, pp. 229–318, 2016, doi: 10.1016/j.pmatsci.2015.06.001.
- [42] S. Sharma and A. Kumar, *Keratin as a Protein Biopolymer*. 2019. [Online]. Available: <http://www.springer.com/series/13173>
- [43] H. Xie, S. Li, and S. Zhang, "Ionic liquids as novel solvents for the dissolution and blending of wool keratin fibers," *Green Chem.*, vol. 7, no. 8, pp. 606–608, 2005, doi: 10.1039/b502547h.
- [44] R. C. De Guzman, S. M. Tsuda, M. T. N. Ton, X. Zhang, A. R. Esker, and M. E. Van Dyke, "Binding interactions of keratin-based hair fiber extract to gold, Keratin, and BMP-2," *PLoS One*, vol. 10, no. 8, pp. 1–22, 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0137233.
- [45] X. Lü and S. Cui, "Wool keratin-stabilized silver nanoparticles," *Bioresour. Technol.*, vol. 101, no. 12, pp. 4703–4707, 2010, doi: 10.1016/j.biortech.2010.01.110.
- [46] "ColorQube 8580, Impresoras color: Xerox." <https://www.xerox.es/es-es/oficina/impresoras/colorqube-8580> (accessed Nov. 22, 2022).
- [47] S. Angel, "Estudio de la sensibilidad de un sensor SPR mediante el uso de super-nanoestructuras de oro," Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, 2020.
- [48] S. Eustis and M. A. El-Sayed, "Determination of the aspect ratio statistical distribution of gold nanorods in solution from a theoretical fit of the observed inhomogeneously broadened longitudinal plasmon resonance absorption spectrum," *J. Appl. Phys.*, vol. 100, no. 4, p. 044324, Aug. 2006, doi: 10.1063/1.2244520.
- [49] A. K. Sahu, A. Das, A. Ghosh, and S. Raj, "Understanding blue shift of the longitudinal surface plasmon resonance during growth of gold nanorods," *Nano Express*, vol. 2, no. 1, 2021, doi: 10.1088/2632-959X/abd966.
- [50] T. Tozar, I. R. Andrei, R. Costin, R. Pirvulescu, and M. L. Pascu, "Case series about ex vivo identification of squamous cell carcinomas by laser-induced autofluorescence and Fourier transform infrared spectroscopy," *Lasers Med. Sci.*, vol. 33, no. 4, pp. 861–869, 2018, doi: 10.1007/s10103-018-2445-5.
- [51] J. F. Moulder, W. F. Stickle, P. E. Sobol, and K. D. Bomben, *Handbook of X-ray Photoelectron Spectroscopy*. United States of America: Perkin-Elmer Corporation, 1992.
- [52] X. Liu *et al.*, "Enhanced Electrochemical Performance of PEO-Based Composite Polymer Electrolyte with Single-Ion Conducting Polymer Grafted SiO₂ Nanoparticles," *Polymers (Basel)*, vol. 15, no. 2, 2023, doi: 10.3390/polym15020394.
- [53] D. V. Yakimchuk *et al.*, "Morphology and microstructure evolution of gold nanostructures in the limited volume porous matrices," *Sensors (Switzerland)*, vol. 20, no. 16, pp. 1–13, 2020, doi: 10.3390/s20164397.
- [54] G. Lewis and C. F. Shaw, "Competition of Thiols and Cyanide for Gold (I)," *Inorg. Chem.*,

vol. 25, no. 1, pp. 58–62, 1986, doi: 10.1021/ic00221a016.

[55] F. N. Lyonga, S. H. Hong, E. J. Cho, J. K. Kang, C. G. Lee, and S. J. Park, “As(III) adsorption onto Fe-impregnated food waste biochar: experimental investigation, modeling, and optimization using response surface methodology,” *Environ. Geochem. Health*, vol. 43, no. 9, pp. 3303–3321, 2021, doi: 10.1007/s10653-020-00739-4.

[56] N. Walji, “Characterization of fluid flow in paper-based microfluidic devices,” no. July, p. 65, 2015.

[57] J. Potter, P. Brisk, and W. H. Grover, “Using printer ink color to control the behavior of paper microfluidics,” *J. Lab a Chip*.