



Universidad de Granada

PROGRAMA DE DOCTORADO EN QUÍMICA

TESIS DOCTORAL

**SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE CARBONO
LUMINISCENTES PARA SU USO EN (BIO)SENSORES**

Autor: Fabio Murru

Directores: Luis Fermín Capitán Vallvey y Alfonso Salinas Castillo

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Fabio Murru
ISBN: 978-84-1306-565-6
URI: <http://hdl.handle.net/10481/63340>

Directores de Tesis

L. Fermín Capitán Vallvey

Alfonso Salinas Castillo

Doctorando

Fabio Murru

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, en particular a mi madre

La verdad es que no soy una persona que espera la ayuda de las demás a menudo, y que tenga que agradecer por eso. Mis quehaceres los intento realizar por mí mismo, porque aunque no parezca tengo confianza y amor propio.

Sin embargo, realizar una tarea tan compleja como es la redacción de una Tesis Doctoral y sobre todo la realización de los experimentos y la preparación previa que eso conlleva no hubiera sido posible sin la aportación de muchas personas, a las que me siento agradecido aunque no lo demostré.

Esta parte de la presente Tesis Doctoral está dedicada a los Agradecimientos para quién me haya ayudado a realizar, de una forma directa o indirecta, la misma.

En primer lugar quisiera agradecer a mis Directores de Tesis, eso es a Alfonso Salinas Castillo y a Luis Fermín Capitán Vallvey, sin los que no hubiera sido posible la realización de la Tesis. El Prof. Fermín Capitán Vallvey primero me ha acogido dentro de nuestro grupo ECsens, compuesto por excelentes profesionales y mejores personas empezando por él y Alfonso. Luego, me ha asesorado en mi trabajo, por ejemplo en la redacción de la memoria de la Tesis, en la supervisión de las tareas experimentales, en las actividades del Programa de Doctorado en calidad de Tutor. Ha sido el Prof. Alfonso Salinas Castillo que me ha asesorado en las tareas experimentales, tras haberme explicado el maravilloso mundo de los Cdots de los que antes ignoraba la existencia, de cómo poder usarlos en la determinación analítica y de cómo publicar un trabajo científico en un medio de impacto contrastado, entre otras cosas. Ambos Directores han sabido guiarme y motivarme en estos años, cuando el trabajo salía bien y cuando desgraciadamente no salía según las expectativas.

Agradezco al personal de la Escuela de Posgrado y de la Escuela de Doctorado de Ciencias, Tecnologías e Ingenierías, por haber llevado a cabo los trámites que me han permitido primero el depósito y luego la defensa de la presente Tesis Doctoral. Agradezco muchísimo a los miembros del Tribunal, por haber dedicado su tiempo a evaluar la presente Tesis Doctoral y su defensa.

Hablando del tema económico, este trabajo de investigación ha sido apoyado por los Proyectos CTQ-2013-44545-R y CTQ2016-78754-C2-1-R del MINECO y P10-FQM-5974 de la Junta de Andalucía; este último fue financiado por los Fondos Europeos de Desarrollo Regional (FEDER).

El programa del Plan Propio “Reincorporación de Doctores UGR” ha también aportado importantes subvenciones para el desarrollo del trabajo de investigación descrito en la presente Tesis Doctoral.

Quiero agradecer a Fran Romero, Roberto Sánchez Mudarra, Francisco J. García Ruiz y a los profesores Almudena Rivadeneyra, José F. Salmerón y Diego P. Morales del Departamento de Electrónica y Tecnología de Computadores, afiliados también al grupo Ecsens, por haber colaborado tanto en las tareas de investigación como en la publicación de sus resultados significativos en un medio de impacto contrastado como la revista *Nanomaterials*, que también agradezco por la importancia de su labor junto al personal de su editorial MDPI.

Una mención especial va a todos los compañeros del grupo ECsens que me han acompañado en esta aventura: Inma, José, Miguel, Ignacio, Loli, Natalia, Carmen Valencia, Alberto Palma, Isa, Sara, Manu, Fátima, Lapre, Jesús, Pablo, Antonio, Sergio, Miguel Ángel, David, entre otros. También quiero agradecer a los compañeros que ya no trabajan en el Departamento, tales como Alejandro y Hansa, Carmen y Marta, Inma Suarez y María Luisa. A José Vega, Vicente, Salva, Eli, Belén y Mari Carmen. A Mariano, Paco, Fernando, Javier y a todos los que me ayudaron a afrontar esta tarea que por mis circunstancias personales se me antojaba complicada.

A mi casero y a mis compañeros y compañeras de piso y, en general, a todas las personas que considero amigas, por haberme arropado en los momentos difíciles y haberme ayudado a evadirme cuando más lo necesitaba.

A mi familia, que desde lejos me añora y me acoge con cariño cada vez que nos juntamos. A mi hermana, a mi padre, a mis padrinos, a mi madrina, a mis primos, a mis tíos, a mis sobrinos y parientes: ¡gracias por todo! Un pensamiento también para quién se ha ido y sigue presente aunque no físicamente: este trabajo está dedicado también a vosotros. Quiero agradecer a quién hizo un esfuerzo para estar en mi defensa de la Tesis Doctoral, arropándome en un momento tan importante. Para agradecer a mi madre me sobrarían las palabras: *Mamma, per ricambiare quello che stai facendo per me avrei bisogno di nove cloni!*

ÍNDICE

Índice	1
Acrónimos	9
Objetivos	19
Capítulo I.....	25
Introducción	27
1. Nanociencia y Nanotecnología Analíticas	29
1.1. Contextualización de Nanociencia y Nanotecnología.....	31
1.2. Tipos de nanopartículas.....	34
1.3. Nanopartículas de carbono (Cdots).....	38
2. Utilidad de los Cdots en sensores químicos.....	44
2.1. Fundamentos de luminiscencia	45
2.2. Similitudes y diferencias entre tipos de luminiscencia	50
2.3. Impacto práctico de los Cdots.....	51
2.3.1. Metodologías analíticas	52
2.3.1.1. Detección (bio)química	53
2.3.1.2. Detección electroquimioluminiscente.....	54
2.3.1.3. Detección fotoelectroquímica.....	54
2.3.2. Aplicaciones biomédicas	55
2.3.2.1. Bioimagen	55
2.3.2.2. Tratamiento del cáncer	57

3. Cdots en la Nanociencia y Nanotecnologías Analíticas	61
3.1. Cdots como herramienta analítica	62
3.1.1. Cdots como sensores ópticos	64
3.1.2. Cdots en reacciones catalíticas.....	68
Capítulo II.....	71
Materiales y Métodos	73
1. Productos químicos.....	75
2. Materiales.....	76
3. Instrumentación y software	77
4. Metodologías.....	78
4.1. Espectrofluorimetría.....	78
4.2. Espectrofotometría UV-Vis	80
5. Rendimiento cuántico de fluorescencia de los Cdots	81
Capítulo III.....	83
Determinación fosforimétrica de biotioles basada en Carbon Dots	85
1. Introducción	87
1.1. ¿Qué son los Cdots? Propiedades y ventajas sobre otros nanomateriales	87
1.2. ¿Qué son los biotioles? Características, interés de su detección, tipos de detección.....	88
1.3. ¿Cómo se determinan los biotioles mediante los Cdots?.	92
1.3.1. Uso del ion Hg^{2+} para la detección de biotioles mediante Cdots.....	93

1.4. Interés en el desarrollo de sensores fosforimétricos para la determinación de los biotioles	95
2. Objetivos	96
3 Síntesis y funcionalización de los Cdots.....	96
4. Caracterización de los Cdots.....	98
4.1. Cálculo del peso seco de los Cdots	98
4.2. Caracterización espectroscópica de los Cdots	98
5. Optimización del sistema de detección de los biotioles basados en Cdots.....	102
5.1. Concentración de los Cdots	102
5.2. Estabilidad de la luminiscencia de los Cdots.....	103
5.3. Dependencia del pH en el comportamiento luminiscente de los Cdots	104
5.4. Influencia de la fuerza iónica sobre la luminiscencia de los Cdots	105
5.5. Optimización de la concentración de iones metálicos	106
5.5.1. Estudios de la atenuación por Fe^{3+}	107
5.5.2. Estudios de la atenuación por Cu^{2+}	109
5.5.3. Estudios de la atenuación por Zn^{2+}	111
5.5.4. Estudios de la atenuación por Al^{3+}	114
5.5.5. Influencia de la concentración de Hg^{2+}	116
6. Caracterización analítica	119

Índice

6.1.	Efecto de la concentración de Hg^{2+} sobre la luminiscencia de los Cdots	120
6.2.	Sistemas en disolución basados en Cdots y Hg^{2+} para la detección fosforimétrica de biotioles	121
6.3.	Estudio de la selectividad de los sistemas en disolución basados en Cdots y Hg^{2+} para la detección fosforimétrica de biotioles.....	125
6.4	Determinación del analito L-Cys mediante los sistemas en disolución basados en Cdots.....	130
6.4.1.	Ensayos de selectividad del sistema en disolución basado en Cdots en la detección del analito L-Cys en presencia de posibles interferentes	131
6.5.	Determinación del analito L-GSH mediante los sistemas en disolución basados en Cdots.....	136
6.5.1.	Ensayos de selectividad del sistema en disolución basado en Cdots en la detección del analito GSH en presencia de posibles interferentes	137
6.6.	Límite de detección (LOD).....	138
6.7.	Límite de cuantificación (LOQ).....	138
6.8.	Comparación de los sistemas en disolución basados en Cdots con los sensores encontrados en la literatura para la detección de los biotioles	139
6.9.	Sistemas en disolución basados en Cdots para detección de L-Cys: ventajas e inconvenientes	144
6.10.	Sistemas en disolución basados en Cdots para detección de GSH: ventajas e inconvenientes	145
Capítulo IV.....		147
Sensor luminiscente basado en Carbon Dots para la determinación de hemoglobina y su implementación en un dispositivo portátil.....		149
1.	Introducción	151

1.1.	La hemoglobina: interés de su determinación	151
1.2.	Métodos para determinación de Hb	153
1.3.	Ventajas de la detección luminiscente basada en Cdots con respecto a otras estrategias	156
1.4.	Mecanismos de detección de Hb basados en Cdots y H ₂ O ₂	157
2.	Objetivos	158
3.	Caracterización y propiedades ópticas de los Cdots sintetizados	158
3.1.	Caracterización de los Cdots.....	158
3.2.	Propiedades ópticas de los Cdots sintetizados	161
4.	Mecanismo de atenuación de la luminiscencia de los Cdots por Hb.....	163
5.	Optimización del sistema en disolución basado en Cdots y H ₂ O ₂ para determinación de la Hb.....	166
6.	Determinación de la Hb en el sistema sensor Cdots/ H ₂ O ₂ en espectrómetro de luminiscencia	167
7.	Desarrollo del prototipo de instrumentación portátil para medidas de luminiscencia	169
7.1	Configuración de medida para el dispositivo portátil	170
7.2.	Algoritmo de medida.....	171
7.3.	Implementación del prototipo y su aplicación.....	173
8.	Resultados y Discusión.....	176
8.1.	Caracterización analítica del sensor implementado en el instrumento portátil para la determinación RTP de la Hb	176
8.2.	Estudio de interferencias	177
8.3.	Aplicación al análisis de muestras reales	178
8.4.	Comparación de métodos basados en sensores para Hb	179
8.5.	Sensor basado en Cdots y H ₂ O ₂ para la determinación de la Hb en espectrómetro de luminiscencia: ventajas e inconvenientes	185
8.6.	Sensor implementado en un instrumento portátil basado en Cdots y H ₂ O ₂ para determinación de la Hb: ventajas e inconvenientes.....	185

Índice

Conclusiones	187
Referencias	193
Anexos	209
<i>Anexo I: Portable Instrument for Hemoglobin Determination Using Room-Temperature Phosphorescent Carbon Dots</i>	213
<i>Anexo II: Carbon dots as sensing layer for printed humidity and temperature sensors</i>	227
<i>Anexo III: Documento de Actividades del Doctorando</i>	237

ACRÓNIMOS

Acrónimos

Muchos compuestos químicos y diferentes técnicas tienen nombres largos y complejos, por ello se ha establecido un listado de sus acrónimos para que el lector pueda consultarlo cada vez que lo crea oportuno y la lectura de esa Tesis Doctoral resulte más fácil. Los acrónimos están ordenados en orden alfabético.

0D: De dimensión cero.

2D: Bidimensional.

3D: Tridimensional.

5-FU: 5-Fluorouracilo.

τ : Tiempo de vida.

AC: Ácido cítrico.

AChE: Acetilcolinesterasa.

ADC: Convertidor digital analógico.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

AFP: Alfa-fetoproteína humana.

Ag⁰: Plata elemental.

AgNPs: Nanopartículas de plata.

Arg-Cdots: Cdots modificados con arginina.

ARNip: ARN pequeño de interferencia o ARN de silenciamiento.

AuNCs: Nanoclusters de oro.

AuNPs: Nanopartículas de oro.

B, N-Cdots: Nanopartículas de carbono bifuncionalizadas *in situ* con ácido borónico y grupos amino.

Bottom-up: De abajo a arriba, o de tipo “ascendente”.

BPA: Bisfenol A.

BPMA: Bis (3-piridilmetil) amina.

BPS: Bisfenol S.

BSA: Albúmina de suero bovino.

CB: Banda de conductancia.

Cdots: Carbon Dots, o nanopartículas de carbono.

CI: Conversión interna.

CNT: Nanotubos de carbono.

Cys: Cisteína.

DA: Dopamina.

D-Cdots: Cdots dextrógiros.

DL-Cys: DL-Cisteína (cisteína en mezcla isomérica).

DLS: Dispersión dinámica de luz.

DMF: N, N-dimetilformamida.

D-NPs: Nanopartículas de doble emisión.

DOX: Doxorubicina.

DSPE-PEG: 1,2-distearoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi (polietilenglicol)-2000]

DSPE-PEG-TCPP: DSPE-PEG modificado con tetrakis (4-carboxifenil) porfirina.

ECL: Electroquimioluminiscencia.

ECV: Enfermedades cardiovasculares.

Acrónimos

EDA: Etilendiamina.

EDC: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

EDX: Espectroscopía de energía de dispersión de rayos X.

EOC: Fin de conversión.

ESIPT: Transferencia intramolecular de protón en el estado excitado.

FE-SEM: Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo.

FITC: Isotiocianato de fluoresceína.

FRET: Transferencia de energía de resonancia de fluorescencia(o de Förster).

FTIR: Espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier.

FWHM: Anchura a media altura.

G-CDs: Cdots en forma de gel.

g-CNQdots: Puntos cuánticos de nitruro de carbono grafítico.

GCE: Electrodo de carbon vítreo.

GOx: Glucosa oxidasa.

GQdots: Puntos cuánticos de grafeno.

GSH: Glutation (forma reducida).

GSSG: Disulfuro de glutation (forma oxidada).

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno.

H₂S: Ácido sulfhídrico.

Hb: Hemoglobina.

Hb-Fe⁴⁺=O: Ferril hemoglobina.

HCdots: Cdots hidrofóbicos.

HCNT: Nanotubos de carbono helicoidales.

Hcy: Homocisteína.

HDD: Disco duro o disco rígido.

HER: Reducción de la evolución del hidrógeno.

Hg⁰: Mercurio elemental.

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución o rendimiento.

HR-TEM: Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución.

HSA: Albúmina de suero humano.

kDa: Kilodalton.

I_a: Intensidad de luz absorbida.

IB: InfiniBand.

IDM: Indometacina.

IFE: Efecto de filtro interno.

IMPLY: Tipo de puerta lógica. No se fabrica, solamente se emplea en esquemas.

IoT: Internet de las cosas.

IP: Grado de protección.

L-Arg: L-Arginina.

L-Asn: L-Asparagina.

L-Cdots: Cdots levógiros.

Acrónimos

L-Cys: L-Cisteína.

L-DOPA: Levodopa.

LED: Diodo emisor de luz.

L-Gln: L-Glutamina.

L-Glu: Ácido L-glutámico.

L-GSH: L-Glutation.

L-His: L-Histidina.

L-Lys: L-Lisina.

LOD: Límite de detección.

LOQ: Límite de cuantificación.

L-Ser: L-Serina.

LTP: Fosforescencia a baja temperatura.

m-BiVO₄: Vanadato de bismuto monoclinico.

MetHb: Metahemoglobina.

Mg, N-Cdots: Cdots co-dopados con magnesio y nitrógeno.

MIP, MIPs: Polímero(s) de impresión molecular.

MNP: Nanopartículas magnéticas.

MOFs: Redes metal-orgánicas.

MPA: Ácido 3-mercaptopropiónico.

MR: Resonancia magnética.

MWCNT: Nanotubos de carbono de paredes múltiples.

NAC: N-acetil-1-cisteína.

N-Cdots: Cdots dopados con nitrógeno.

NIR: Infrarrojo cercano.

N,S-Cdots: Cdots codopados con nitrógeno y azufre.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

OP: Plaguicidas organofosforados.

PBNP: Nanopartículas de azul de Prusia.

PCdots: Cdots sobre papel.

PCP: Pentaclorofenol.

PD: Fotodegradación.

PEC: Célula fotoelectroquímica.

PEG: Polietilenglicol.

PEI: Polietilenimina.

PET: Transferencia fotoinducida de electrones.

PGA: Amplificador de ganancia programable.

pI: Punto isoeléctrico.

P,N-Cdots: Nanopartículas de carbono codopadas con fósforo y nitrógeno.

POC: Dispositivos de punto de atención.

PrHy: Clorhidrato de prometazina.

PSoC: Programmable System on Chip® (microcontrolador).

PVA: Alcohol polivinílico.

Acrónimos

PWM: Pulse-Width Modulation (Modulación de ancho de pulso).

Qdots: Quantum Dots, o puntos cuánticos semiconductores.

QY: Rendimiento cuántico de fluorescencia.

RhB: Rodamina B.

RNasa A: Ribonucleasa A.

RMN: Resonancia magnética nuclear.

ROS: Especies reactivas de oxígeno.

RSD: Desviación estándar relativa.

RTP: Fosforescencia a temperatura ambiente.

RV: Relajación vibracional.

S₀: Estado electrónico fundamental.

S: Espín total.

SERS: Dispersión Raman mejorada en superficie.

SI: Tipo de puerta lógica, que realiza la función booleana igualdad. En la práctica se suele utilizar como amplificador de corriente o como seguidor de tensión, para adaptar impedancias.

SIDA: Síndrome de inmunodeficiencia adquirida.

SiNCs: Nanocristales de silicio.

SLS: Laurilsulfato sódico.

SR: Grupo tiol.

STM: Microscopio de efecto túnel.

SWCNT: Nanotubos de carbono de pared única.

TEM: Microscopía electrónica de transmisión.

TFD: Terapia fotodinámica.

TMB: 3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina.

TNT: Trinitrotolueno.

Top-down: De arriba abajo, o de tipo “descendente”.

TPCA: Ácido 5-oxo-3,5-dihidro-2H-tiazol [3,2-a] piridin-7-carboxílico.

TPDCA: Ácido 5-oxo-3,5-dihidro-2H-tiazol [3,2-a] piridin-3,7-dicarboxílico.

TPE: Excitación de dos fotones.

TPF: Fluorescencia de dos fotones.

TTA: 2-Tenoiltrifluoroacetona.

UCNPs: Nanopartículas de *up conversion*, o sea de conversión ascendente.

UART: Módulo receptor-transmisor asíncrono universal dúplex completo.

UV: Ultravioleta.

UV-Vis: Ultravioleta-visible.

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana.

WCS: Sensores químicos inalámbricos.

XRD: Difracción de rayos X.

XPS: Espectrometría fotoelectrónica de rayos X.

Y: Tipo de puerta lógica, más conocida por su nombre en inglés *AND*, que realiza la función booleana de producto lógico.

Acrónimos

OBJETIVOS

Objetivos

Los Cdots han ganado importancia por sus características dentro de las Nanociencias y Nanotecnologías Analíticas, es decir la síntesis de estos nanomateriales y el uso de partículas de tamaño nanométrico (1-100 nm en alguna de sus dimensiones) en el ámbito de la Química Analítica.

Esas nanopartículas, alternativas a otras ya desarrolladas y que reducen los problemas de toxicidad y contaminación que presentan, poseen muchas ventajas: en primer lugar, una luminiscencia intensa y ajustable. Además de luminiscencia del tipo “*down-conversion*” los Cdots presentan luminiscencia “*up-conversion*”. Las nanopartículas de carbono resultan interesantes por su inercia química, se prestan a una fácil funcionalización, tienen alta resistencia a la fotooxidación, baja toxicidad, buena biocompatibilidad; por último, aunque no menos importante, una atenuación eficiente de su luminiscencia tanto por aceptores como por donores de electrones en disolución.

Todas estas cualidades de los Cdots se valoran aún más si se consideran los inconvenientes de los materiales de reconocimiento usados habitualmente en sensores, tales como largos tiempos de respuesta, baja sensibilidad y selectividad unida a su escasa estabilidad. Hay que considerar también el interés creciente que los Cdots están adquiriendo en el ámbito de la nanotecnología; su auge en los últimos años, ha llevado al desarrollo de numerosas aplicaciones revolucionarias, a la integración de los resultados de investigación en nuevos materiales y dispositivos tecnológicos y a la solución de problemas con los materiales sensores actuales. Realmente el empleo de las nanotecnologías y nanomateriales puede conducir a una verdadera revolución en la preparación de sensores luminiscentes. Las nanopartículas y nanoestructuras presentan nuevas funcionalidades, un rendimiento superior e impulsan la innovación en un gran número de tecnologías. Por lo tanto, creo en una necesaria investigación para el desarrollo y la búsqueda de nuevas nanopartículas alternativas, que presenten nuevas propiedades y reduzcan los problemas de toxicidad y contaminación. Entre las nuevas nanopartículas alternativas y especialmente entre los diferentes tipos de nanopartículas de carbono, los denominados Cdots están siendo usados en la detección de analitos, sobre todo metales y biomoléculas. La detección de metales suele ocurrir por atenuación de la luminiscencia de las nanopartículas debida a varias posibles interacciones con el ion metálico; ese fenómeno puede además ser aprovechado para poder detectar otros analitos, que a su vez interaccionan con el metal permitiendo la recuperación de la luminiscencia de las nanopartículas y pudiendo ser detectados así de manera indirecta.

Objetivos

Asimismo, la atenuación de la luminiscencia de las nanopartículas puede ser atenuada de manera más significativa por los productos de la reacción que ocurre entre el analito de interés y otras sustancias presentes.

Partiendo de estas hipótesis, justifico el trabajo de investigación llevado a cabo para la presente Tesis Doctoral que fundamentalmente incluye el empleo de estrategias novedosas mediante el empleo de Cdots, nanopartículas tan valiosas que, a mí juicio, pueden constituir un interesante progreso dentro del campo de las fases sensoras luminiscentes.

La presente Tesis Doctoral se desarrolla en el campo de los nanosensores con detección óptica basados en técnicas luminiscentes, capaces de monitorizar *in situ*, en tiempo real y en entornos o microentornos la concentración de especies de interés en el campo biomédico y ambiental. En concreto, se centra en el desarrollo de procedimientos para la medida óptica de tipo luminiscente de analitos de interés clínico y ambiental en disoluciones acuosas.

Para ello se van a realizar ensayos de analitos, tales como biotioles, hemoglobina y metales pesados, basados en la medida de la luminiscencia de disoluciones acuosas de las nanopartículas de carbono y los dichos compuestos de interés, obtenida a partir de un espectrómetro de luminiscencia y un dispositivo portátil de fabricación propia que se prevé implementar mediante el uso de diferentes técnicas de inteligencia artificial. El diseño de un instrumento portátil en el que se implementen los procedimientos de cálculo junto los sensores permitirá una medida de luminiscencia de fácil uso y bajo coste.

Para lograr el objetivo general se plantean un conjunto de objetivos específicos, con la finalidad de desarrollar diferentes aspectos del mismo:

- Síntesis de los Cdots utilizando rutas de tipo hidrotermal, basadas en reacciones químicas a partir de diferentes moléculas precursoras de carbono.
- Funcionalización de la superficie de los Cdots con grupos aminos, seguida de su caracterización mediante técnicas espectroscópicas.

- Desarrollo de procedimientos para la determinación de analitos de interés clínico y biomédico mediante los Cdots sintetizados en función de los cambios luminiscentes producidos por los analitos.
- Diseño y fabricación de un prototipo de instrumentación portátil para las medidas de las propiedades luminiscentes de las nanopartículas desarrolladas.

Objetivos

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Para entender mejor el trabajo de investigación que ha sido llevado a cabo durante estos cuatro años, creo que es importante explicar los conceptos que están en la base de la investigación: los fundamentos científicos y tecnológicos, así como el estado del arte en la Química Analítica en el campo de los (bio)sensores basados en nanopartículas de carbono luminiscente o que de alguna manera las involucran.

En primer lugar, y por partir del principio, hay que contextualizar la Nanociencia y la Nanotecnología Analíticas, que es el ámbito que desarrolla esta investigación. Comentaré los diferentes tipos de nanopartículas, haciendo hincapié en las nanopartículas de carbono, o Carbon Dots (Cdots), que fueron sintetizadas y caracterizadas para luego ser empleadas en diversos (bio)sensores. Por eso fue importante conocer su utilidad en el campo de los sensores químicos.

Como en esta investigación se trató sobre sensores químicos de tipo óptico, concretamente de luminiscencia, es oportuno comentar los fundamentos de la fotoluminiscencia, así como las similitudes y diferencias entre los diferentes tipos de luminiscencia, antes de dar una visión más amplia del impacto práctico de los Cdots en las metodologías analíticas. Los Cdots suelen ser usados en la detección (bio)química de tipo fotoluminiscente y electroquimioluminiscente. Los Cdots tienen también aplicaciones biomédicas, entre ellas la bioimagen y el tratamiento del cáncer.

Dulcis in fundo, trataré el papel relevante que los Cdots se están ganando en el ámbito de la Nanociencia y de la Nanotecnología como herramientas analíticas. Describiré de la manera más exhaustiva posible el estado del arte en el uso de los Cdots en sensores ópticos, y también de su empleo en reacciones catalíticas, aplicaciones interesantes, pero menos pertinentes en mi investigación.

1. Nanociencia y Nanotecnología Analíticas

Durante los últimos 20 años, la investigación y desarrollo en el campo de los sensores ha crecido exponencialmente en términos de inversión financiera, literatura publicada y en el número de investigadores activos. Es sabido que un sensor proporciona información física, química y/o biológica acerca de nuestro entorno, pudiendo ser definido como un dispositivo

capaz de registrar de forma directa, continua y reversible un parámetro físico (sensor físico) o la concentración o presencia de una especie química (sensor químico).

Las diferentes legislaciones fomentaron una enorme demanda de sensores necesarios para la supervisión de nuestro entorno y en este sentido, una nueva revolución está teniendo lugar en la investigación de sensores con una gran demanda de dispositivos en biomedicina, estudios ambientales y agroalimentaria [1,2]. El desafío en la investigación de sensores se puede resumir en las siguientes expectativas:

- a) La búsqueda y selección de los materiales apropiados, así como el desarrollo de nuevos procesos de reconocimiento de analitos y de los mecanismos de transducción que permitan obtener las señales analíticas.
- b) El desarrollo de nuevos materiales y matrices que inmovilicen de forma efectiva el sistema receptor y, de este modo, conseguir una función respuesta estable y reproducible.
- c) Procesos y diseños de fabricación basados en las nuevas tecnologías de impresión que permitan la fabricación automatizada de sensores rebajando costes, posibilitando la miniaturización y el multiplexado y aumentando de esa manera la reproducibilidad de los mismos.

El diseño de un sensor con propósitos analíticos y con una amplia variedad de campos de aplicación (diagnóstico clínico, determinación de agentes contaminantes, control de calidad, etc.) presenta dos aspectos muy críticos que deben ser considerados. Por una parte, la especificidad: el sensor deberá interactuar selectivamente con el analito a determinar, evitando o previniendo las posibles interferencias que den lugar a resultados erróneos. De otra, la sensibilidad: la señal observada deberá ser suficientemente sensible como para permitir la cuantificación del analito a bajas concentraciones en mezclas complejas. Además, y de manera no menos importante, la viabilidad de un sensor está directamente relacionada con la reproducibilidad del ensayo y con la reversibilidad, característica importante, aunque no esencial para un sensor. De los diferentes tipos de sensores, los luminiscentes presentan numerosas ventajas entre las que se encuentran precisamente su alta sensibilidad y especificidad. Su mecanismo de actuación tiene lugar en dos pasos: una primera fase de detección del analito por una molécula o material receptor (fase de reconocimiento) que modifica una propiedad, óptica en nuestro caso, y en segundo lugar la transducción de la

información desde esa respuesta óptica, así una variación de alguna característica estacionaria o temporal de la luminiscencia, a una señal eléctrica (fase de transducción).

Este tipo de actuación les permite, a su vez, ser integrados en sistemas supramoleculares y macroscópicos, que facilitan su manipulación y su aplicabilidad, sin modificar su mecanismo de acción. Una característica adicional de estos sensores es la posibilidad de incorporar prácticamente cualquier biopolímero o sistema mimético implicado en un reconocimiento molecular, lo que ha impulsado el desarrollo de un gran número de sensores que incluyen el uso de anticuerpos y sus fragmentos, proteínas que enlazan ligandos, enzimas, péptidos, polímeros sintéticos, *etc.* Sin embargo, a pesar de las potenciales ventajas de los sensores químicos de naturaleza óptica, la investigación en este campo ha estado frenada por numerosos obstáculos, fundamentalmente por la escasez de compuestos luminiscentes disponibles y los problemas derivados de la limitada estabilidad de las fases sensoras desarrolladas. Con objeto de mejorar las prestaciones de los sensores ópticos y con la idea de buscar soluciones a estos inconvenientes, se está realizando hoy en día un gran esfuerzo investigador, buscando materiales sensores más robustos y apropiados.

1.1. Contextualización de Nanociencia y Nanotecnología

El primero que especuló con la posibilidad de manipular objetos de tamaño nanométrico fue Richard Feynman en la conferencia impartida en la reunión anual de la American Physical Society en Caltech el 29 de diciembre de 1959 bajo el título “*There is plenty of room at the bottom*”. Sin embargo, sólo en 1981 se registró el primer verdadero impulso práctico a la nanotecnología con el desarrollo del primer microscopio efecto túnel (STM) por Binnig y Rohrer, a través del cual fue posible “observar” y manipular la materia hasta los átomos individuales. Tuvimos que esperar el año 1990 para que lo que Feynman había previsto se convirtiera en realidad. En ese año, investigadores de IBM gracias a un STM modificado lograron crear el logotipo de la empresa utilizando átomos individuales de xenón en una superficie de níquel [3]. En los últimos años ha tenido lugar un espectacular desarrollo de herramientas y procesos en el ámbito de la llamada Nanotecnología. Este desarrollo deriva del hecho de que cuando los materiales son sintetizados o manipulados a escala nanométrica pueden presentar nuevas propiedades, funcionalidades y un rendimiento superior para numerosas aplicaciones.

Por ejemplo, la relación área/volumen es baja en sistemas macroscópicos, donde las propiedades químicas y físicas están determinadas por la estructura del material como un todo, mientras que es alta en nanomateriales. En tales estructuras, las características de las superficies serán, por lo tanto, dominantes e influyen en sus propiedades ópticas, propiedades físicas como adhesividad, humectabilidad, fricción o reactividad química, entre otras [3]. Este aspecto resultó esencial para impulsar la innovación en un gran número de tecnologías, dispositivos y sistemas, favoreciendo el desarrollo sostenible y la necesaria competitividad en sectores tales como medicina, transporte, energía, electrónica, fotónica y construcción, entre otros muchos [4,5]. Especialmente, el empleo de nanotecnologías puede conducir a una verdadera revolución en el campo de la biomedicina [6-10]. Recientemente, los nanomateriales se han utilizado para construir electrodos modificados y (bio)sensores para el análisis de muchas sustancias inorgánicas y orgánicas, incluidas trazas de sustancias peligrosas para el medio ambiente [11]. Dichos sensores pueden mostrar ventajas, como, por ejemplo, alta sensibilidad, tiempo de análisis corto, bajo coste, preparación y tratamiento sencillos [12, 13]. Las interacciones anfitrión-huésped se utilizaron también para construir dispositivos a nanoescala con detección electroquímica. Recientemente, muchos investigadores intentaron desarrollar nanocompuestos macrocíclicos (p. ej., ciclodextrinas, calixarenos, pilararenos) y nanomateriales de carbono (p.ej., grafeno, carbon dots, nanotubos de carbono) para muchas aplicaciones [14]. Otros tipos de nanocompuestos están formados por nanomateriales de carbono y polímeros conductores: conjuntos tales como grafeno-poli(*o*-aminofenol), grafeno-poliluminol, grafeno-poli(*o*-fenilendiamina), fibras de carbono/polipirrol o polianilina injertada en nanofibras de carbono integradas en nanotubos de carbono. Algunos de estos nanocompuestos presentan efectos sinérgicos que surgen de las diferencias en la estructura y propiedades de los respectivos materiales constituyentes. Los nanocompuestos están teniendo aplicaciones en la fabricación de sensores y biosensores, materiales anticorrosivos, supercondensadores, fármacos y catálisis [11]. La fusión de la nanotecnología con la biología ha incrementado el interés de la investigación para el diseño y la búsqueda de nanomateriales funcionales que imiten las características catalíticas de las enzimas. Por ejemplo, óxidos de metales pesados (Fe_3O_4 , MnO_2 , Co_3O_4 , CuO , TiO_2 , V_2O_5), sulfuros metálicos (CuS , FeS , CdS , MoS_2) y nanomateriales de carbono (nanoductos de carbono, óxido de grafeno, nanotubos de carbono) que poseen una actividad intrínseca similar a la peroxidasa y tienen un potencial prometedor en (bio)sensores para la remediación ambiental [15,16].

Los electrodos nanoestructurados ya se han aplicado ampliamente con fines analíticos [17-19]. Los electrodos de nanopartículas metálicas permiten la reducción del límite de cuantificación para ciertos analitos: el uso de electrodos de carbón vítreo (GCE) modificados con una capa de nanopartículas de níquel o su óxido, por ejemplo, ha permitido reducir significativamente los límites de determinación de glucosa, en comparación con los obtenidos con un electrodo normal de níquel [20]. Los electrodos de nanopartículas metálicas modificadas con enzimas son sistemas altamente selectivos en los que el metal actúa como un mediador entre el sitio activo de la enzima y la superficie del electrodo, lo que facilita el proceso de transferencia electrónica: por ejemplo, se han fabricado electrodos de nanopartículas de oro modificadas con la enzima glucosa oxidasa para la determinación de glucosa [21]. Finalmente, las capacidades catalíticas de las nanopartículas pueden acelerar las reacciones redox de muchos analitos y hacer que los procesos redox sean reversibles donde no lo son [20]. Un ejemplo de esta utilidad es la determinación de dopamina (DA) en presencia de ácido ascórbico, mediante análisis voltamétrico con un electrodo de nanopartículas de oro que ejerce un efecto catalítico sobre el ácido ascórbico desplazando su oxidación hacia potenciales menos positivos [22]. Numerosas publicaciones y libros describen los métodos de fabricación de los nanomateriales, que se clasifican en dos estrategias básicas: *top down* o *bottom up* [23]. En el enfoque *top down*, a partir del material precursor se puede llegar a las dimensiones deseadas, mediante técnicas de reducción y miniaturización. Estos procesos se aplican sobre todo en la industria de la microelectrónica. Las propiedades físico-químicas de estos materiales nanoestructurados no difieren tanto del patrón de partida, con la excepción de las que cambian a partir de un cierto tamaño [24]. Los métodos de síntesis *bottom up*, por otro lado, permiten la creación de componentes nanométricos, explotando las capacidades de autoensamblaje de átomos o moléculas individuales. Existe la posibilidad de distinguir entre tres tipos diferentes de autoensamblaje, dependiendo del tipo de constituyentes elementales utilizados (átomos, moléculas y agregados). De hecho, se puede hablar de autoensamblaje químico, físico y coloidal [3]. Las nanoestructuras obtenidas tienen propiedades específicas utilizables en diversas aplicaciones [23].

1.2. Tipos de nanopartículas

Las nanopartículas magnéticas (MNP) se podrían usar como nanozimas, pero existen problemas asociados con su aplicación. Algunos de estos materiales, tales como las nanopartículas de BiFeO₃, FeS o los complejos G-cuádruplex-hemina, tienen procesos de síntesis complicados. Además, dado que las MNP son catalizadores heterogéneos, deben estar bien dispersas en disolución acuosa, y ser eliminadas adecuadamente por un imán: ambas son operaciones que requieren tiempo [26]. Otros nanomateriales son las nanopartículas de *up-conversion* (UCNPs), una clase de nanocristales de lantánidos co-dopados, que poseen muchas propiedades atractivas, como alta fotoestabilidad, estabilidad térmica, mejores relaciones señal/ruido y baja toxicidad. Podrían ser una alternativa como donores de energía a los colorantes fluorescentes [27]. Sin embargo, las UCNPs también presentan algunas limitaciones, como síntesis complicada, alto costo y el efecto del sobrecalentamiento con el láser infrarrojo cercano (NIR) de potencia relativamente alta (10^2 - 10^3 mW cm⁻¹) sobre tejidos biológicos o células que es necesario usar para originar la señal [28, 29]. Dentro de las nanopartículas luminiscentes, las más desarrolladas y estudiadas hasta el momento son las nanopartículas de oro (AuNPs) y las conocidas como Quantum Dots (Qdots), habiéndose presentado ambas como una interesante alternativa para el diagnóstico médico o el seguimiento de procesos biológicos. Las nanopartículas de metales nobles han emergido como materiales prometedores con una excelente actividad mimética de la peroxidasa debido a sus propiedades físicas y químicas únicas, tanto por separado o como en aleaciones nanoestructuradas (Au@Pt; AgM (M = Au, Pd, Pt), Au@PtAg y AuPd). Sin embargo, sus aplicaciones prácticas a gran escala están restringidas drásticamente por las desventajas inevitables de los altos precios y la escasez de los metales nobles [15]. Los nanoclusters de oro (AuNCs) han mostrado muchas ventajas en la detección y el etiquetado de moléculas debido a su buena estabilidad, excelentes propiedades fluorescentes, baja citotoxicidad y biocompatibilidad. Se pueden sintetizar mediante la reducción química de sales de oro en presencia de agentes estabilizantes, por ejemplo, albúmina sérica bovina o tiolatos. Acompañados de colorantes u otras nanopartículas fluorescentes, se han empleado para la construcción de sondas fluorescentes ratiométricas como referencia de la señal [30]. Las AuNPs combinan estabilidad química con una alta actividad catalítica para diferentes procesos químicos y electroquímicos [31]. Atribuido a la oscilación colectiva de los electrones de conducción libres inducidos por un campo electromagnético interactivo, las AuNPs poseen propiedades ópticas únicas.

El color de las AuNPs en disolución está determinado por su tamaño y forma [32]. Este tipo de nanomaterial también tiene afinidad por muchas moléculas biológicas, que se unen a las AuNPs sin ver disminuida su actividad biológica [33]. Por ejemplo, una superficie de carbono vítreo se ha modificado con una capa de AuNPs unidas a peroxidasa de rábano picante para obtener un sensor electroquímico para peróxido de hidrógeno [34]. Combinando un dispositivo analítico microfluídico basado en papel (μ PAD) y la técnica de impresión molecular, se ha fabricado una célula fotoelectroquímica (PEC) de radiación visible para la detección de pentaclorofenol (PCP) en un electrodo de trabajo de papel decorado con AuNPs utilizando nanopartículas de ZnO funcionalizadas con polipirrol [35]. Las AuNPs poseen dos propiedades dependientes del tamaño: el color y la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET). El cambio de color se verifica cuando las AuNPs pasan de estar dispersas a un estado agregado, debido a las interacciones con otras nanopartículas, tales como los Cdots [10]. Por otra parte, las AuNPs mediante un mecanismo FRET atenúan la fluorescencia de los Cdots [10]. Además, es sabido que las AuNPs tienen altos coeficientes de absorción molar, una ancha banda de absorción, por lo tanto, podrían aplicarse como aceptores eficientes para la mayoría de fluoróforos [27]. Los ensayos basados en AuNPs han recibido una atención considerable para la determinación de biomoléculas tioladas [26, 28]. Hasta ahora, la mayoría de los sensores colorimétricos basados en nanopartículas metálicas se centran en AuNPs [16], aunque su selectividad puede verse influenciada por algunos compuestos químicos [36]. El oro y la plata tienen casi idénticos parámetros de red y, en base a estas similitudes, se podría esperar que las nanopartículas de plata (AgNPs) siendo relativamente más baratas tuvieran un empleo más extendido en los sensores colorimétricos [28]. No obstante, debe indicarse que la fácil oxidación de la superficie de las AgNPs es una desventaja intrínseca, que compromete seriamente su aplicación en sistemas reales. Hasta ahora, se han reportado muchos enfoques para obtener AgNPs estables a través del recubrimiento superficial con moléculas biológicas, pequeñas moléculas orgánicas y/o mediante su deposición sobre materiales de carbono. Sin embargo, por otro lado, el recubrimiento de dicho metal reduce su rendimiento catalítico, debido al bloqueo de los sitios activos de la superficie. Por lo tanto, es deseable desarrollar AgNPs no tensioactivas con una alta superficie activa y buena estabilidad. Por ejemplo, se ha desarrollado un sistema colorimétrico (AgNPs-N-GQdots-TMB-H₂O₂) para la detección de GSH en muestras de sangre [16].

Los Qdots han demostrado ser superiores a los colorantes fluorescentes orgánicos, debido a su alta luminiscencia, excelente fotoestabilidad, emisión ajustable por tamaño y alto rendimiento cuántico (QY) [37]. Por eso, se utilizan habitualmente como donores de energía en los sistemas basados en el fenómeno de FRET [27]. Siguen teniendo un interés significativo debido a sus propiedades electro-ópticas únicas [37]. Descubiertos durante la década de los 80, son semiconductores con excitones confinados en las tres dimensiones espaciales. Tienen altos coeficientes de extinción y, por lo tanto, se usan para aplicaciones ópticas [38]. Qdots como ZnS, ZnSe, CdS, CdSe y nanocristales de silicio (SiNCs) se están usando ampliamente como materiales fluorescentes, pero su efecto citotóxico y la degradación de la capa exterior pueden causar muchas reacciones indeseables *in vivo* [5]. De entre los Qdots, los SiNCs han sido objeto de particular interés en los últimos años como agentes de formación de imágenes, ya que exhiben una biocompatibilidad favorable, baja citotoxicidad e incluso auto-eliminación. A pesar de que tienen esta serie de ventajas, algunos inconvenientes dificultan el uso de SiNCs en aplicaciones prácticas. Por ejemplo, la mayoría de los SiNCs actuales requieren rutas de al menos dos pasos para hacerlos dispersables en agua: primero la síntesis de SiNCs hidrófobos mediante métodos físicos o químicos sofisticados, y luego su recubrimiento con moléculas hidrofílicas. Esta metodología sintética logra éxito en la producción de SiNCs fluorescentes con un gran potencial interés en bioimagen; sin embargo, implica un conjunto de procedimientos relativamente complicados que son difíciles de reproducir. Se ha reportado el desarrollo de un método rápido de un solo paso en microondas para la síntesis de Qdots fluorescentes de silicio. Este método es simple y rentable. Hasta ahora, las aplicaciones de los SiNCs fluorescentes se han centrado en bioimagen con pocos estudios acerca de detección química, así, por ejemplo, se ha reportado una estrategia para la detección rápida de Hg^{2+} en disoluciones acuosas, basada en SiNCs fluorescentes sin etiquetas dispersables en agua [39]. Por otra parte, se ha publicado que los Qdots presentan baja estabilidad y una emisión intermitente (fenómeno conocido como *blinking*) [37, 40]. El sistema híbrido de ZnS dopados con manganeso y recubiertos de ácido 3-mercaptopropiónico (MPA-Mn: ZnS Qdots) ha sido desarrollado como interruptor fosforescente *off-on* basado en un mecanismo químico redox para la detección de glutatión (GSH) en alimentos, vino y muestras biológicas [41]. Es importante tener en cuenta que, a la hora de realizar investigación sobre estos temas, es preciso minimizar la toxicidad de las nanopartículas empleadas como (bio)sensores, siendo éste uno de los grandes problemas que presentan las nanopartículas mencionadas anteriormente, pues debido al contenido de metales

tóxicos, como plomo, cadmio, oro, plata y silicio [42], éstas son perjudiciales para la salud y el medio ambiente [28, 29, 43, 44].

Ello supone una seria limitación para su uso en aplicaciones biomédicas tanto *in vivo* como *in vitro* [37, 40]. Además, los métodos de preparación de los Qdots son a menudo complicados y lentos [27, 37, 40, 43]. Por estos motivos es necesaria investigación sobre el desarrollo de nuevas nanopartículas, alternativas a las ya desarrolladas y que reduzcan los problemas de toxicidad y contaminación [43, 45]. En este sentido, los Cdots constituyen uno de los nanomateriales, de muy reciente aparición, más prometedores para solventar dichos problemas. Los Cdots son uno de los muchos nanomateriales basados en carbono, que han atraído más atención desde su descubrimiento [42]. Aunque todos estos materiales exhiben fotoluminiscencia en la parte visible del espectro, difieren en varias características tales como forma, hibridación del carbono, el grado de cristalinidad y el origen de la fluorescencia [46]. Los nanotubos de carbono (CNT) son estructuras huecas que pueden incluir líquidos o gases y, por lo tanto, se pueden usar en catálisis heterogénea y para almacenamiento de energía [24, 26]. Sus propiedades eléctricas también son especialmente interesantes, ya que dependiendo de su diámetro y del ángulo de enrollamiento de la estructura tubular, pueden tener comportamiento metálico o semiconductor [3]. Tanto los nanotubos de carbono de pared única (SWCNT) como los nanotubos de carbono helicoidales (HCNT) deben ser funcionalizados en la superficie para mejorar su solubilidad en agua. Por otra parte, su purificación es un proceso laborioso [26]. Se ha establecido un sistema de detección para el análisis de GSH mediante el uso de un novedoso nanomaterial fluorescente de carbono: los puntos cuánticos de nitruro de carbono grafítico (g-CNQdots). Sin embargo, la síntesis de g-CNQdots requiere condiciones estrictas tales como una temperatura muy alta (550 °C) y tratamiento con ácidos fuertes [29]. Además, el estudio de este nanomaterial todavía se encuentra en una etapa muy temprana, y aspectos como QY y dispersabilidad deben ser mejorados [28]. Debido a su gran área superficial específica, gran resistencia mecánica y bajo costo de fabricación, el grafeno se consideró un soporte bidimensional (2D) ideal para nanopartículas metálicas. Además, los materiales de la familia del grafeno presentan propiedades interesantes que serían favorables para el diseño de miméticos enzimáticos basados en nanomateriales. Las áreas abiertas de grafeno son fácilmente accesibles a los sustratos con una pequeña barrera de difusión y transporte, mientras que su rica química de superficie asegura la estabilidad de los sistemas compatibles [15].

Ha sido reportada la fabricación de un nuevo tipo de nanomateriales con un tamaño inferior a 100 nm, llamados puntos cuánticos de grafeno (GQdots) [13, 47]. Generalmente están compuestos de una o dos nanoláminas de grafeno con una distribución de tamaño principalmente en el rango de 3-20 nm. Los GQdots son altamente luminiscentes como resultado del confinamiento cuántico y los efectos de borde. Las cantidades de grupos que contienen oxígeno, los defectos estructurales y los elementos dopantes también contribuyen considerablemente a las propiedades de luminiscencia de los GQdots. Los GQdots sintetizados contienen sólo átomos de carbono y oxígeno; estudios recientes muestran que los GQdots dopados con heteroátomos como nitrógeno, boro, azufre, flúor y cloro pueden sintonizar efectivamente su banda prohibida y densidad electrónica, así como mejorar su QY y su actividad química [47]. Tienen mayor área de superficie, mayor diámetro y mejores propiedades para injertar en superficie en comparación con los convencionales Qdots y los Cdots. Además, los GQdots muestran una excelente solubilidad en agua, baja toxicidad, alta estabilidad, buena biocompatibilidad y resistencia a largo plazo al fotoblanqueo [13, 16, 47]. Esos GQdots dopados con heteroátomos se han aplicado en campos distintos, tales como en el desarrollo de células de combustible, la optoelectrónica, la bioimagen y los (bio)sensores. Se considera un material prometedor para reemplazar los nanocristales semiconductores utilizados comúnmente en una serie de aplicaciones relacionadas con la biodetección. En los últimos años se han desarrollado varias técnicas novedosas de detección de biotioles basadas en GQdots [13, 16, 48, 49]. Mientras tanto, varios trabajos han sugerido que las propiedades ópticas del grafeno podrían ajustarse a través de las interacciones con los lantánidos, tales como Er, Yb y Eu. Por ejemplo, se han preparado GQdots de europio a partir de un complejo tridimensional (3D) de europio y grafeno usando H_2SO_4 concentrado y HNO_3 [47]. También es importante señalar la combinación del grafeno con las AuNPs y las AgNPs [9, 16].

1.3. Nanopartículas de carbono (Cdots)

Los Cdots son una clase de nanomateriales de carbono con tamaños típicamente inferiores a 10 nm, que fueron obtenidos por primera vez en 2004, durante la purificación mediante electroforesis preparativa de SWCNT fabricados por métodos de descarga de arco por Xu *et al.* [5, 27, 42, 50-58].

Este interesante descubrimiento en el ámbito de la nanociencia que despertó gran interés se refiere a una de las formas alotrópicas del carbono de tamaño nanométrico [57, 59]. Aunque el carbono se considera habitualmente que tiene baja solubilidad en agua y baja fluorescencia, en forma de Cdots muestra una intensa luminiscencia y buenos QY, lo que justifica el gran interés que despertó [60]. En el escaso tiempo transcurrido desde su aparición, se ha realizado un gran avance en la síntesis, propiedades y aplicaciones de los Cdots. Esas nanopartículas se diferencian en la composición elemental de los Qdots tradicionales, que generalmente están compuestos de metales pesados. Los Cdots no tienen esencialmente elementos metálicos involucrados, lo que los dota de baja toxicidad [55]. Aunque no se conozca exactamente su estructura, generalmente los Cdots son nanopartículas pseudo esféricas de 2-10 nm de diámetro, o sea de dimensión cero (0D) [58, 61]. El núcleo de los Cdots puede ser amorfo o cristalino, compuesto prevalentemente de carbono grafítico (sp^2) o láminas de grafeno/óxido de grafeno rodeados por diversas unidades funcionales de carbono hibridado tipo diamante (sp^3) [53, 57, 61, 62]. Mediante medidas de resonancia magnética nuclear (RMN) se ha demostrado que los átomos de carbono de los Cdots son de tipo sp^2 hibridados con átomos de carbono no saturados sp^3 , lo que indica que los Cdots son sistemas conjugados [46]. Los abundantes grupos carboxilo e hidroxilo en la superficie de los Cdots le imparten una alta solubilidad en agua y son grupos químicamente reactivos adecuados para la funcionalización o pasivación de la superficie [53]. Por otra parte, los Cdots muestran una fotoluminiscencia intensa y ajustable por lo que presentan interés en aplicaciones en energía y catálisis [53, 63, 64]. Es importante destacar que los Cdots exhiben una amplia gama de espectros de emisión dependientes de la excitación, que son sensibles a los entornos locales de los Cdots, haciendo posible las diversas aplicaciones en detección [56, 62]. A esto hay que añadir que los Cdots además de luminiscencia tipo *down-conversion* presentan luminiscencia *up-conversion* lo que permite su uso en sistemas analíticos y biológicos [64]. En comparación con los semiconductores tradicionales tipo Qdots y colorantes orgánicos, los Cdots son superiores en términos de mayor solubilidad en agua, robustez, inercia química, fácil funcionalización, alta resistencia a la fotooxidación, baja toxicidad y buena biocompatibilidad [14, 26-29, 37, 40, 44, 50-55, 58, 59, 61, 62, 64-77]. De aquí resultan sus potenciales aplicaciones en etiquetado biológico, sensores, bioimagen, liberación de fármacos, biomedicina, catálisis y detección [10, 27, 42, 43, 46, 48, 51-54, 64, 67, 70, 72, 78, 79]. Mientras tanto, en comparación con otros nanomateriales fluorescentes de carbono como el grafeno y los g-CNQdots, los Cdots tienen muchas más fuentes de materias primas, un QY bastante alto y muy buena dispersabilidad en medio acuoso [28, 29, 64, 79].

Los Cdots generalmente heredan los grupos funcionales (principalmente carboxilo, carbonilo, amino, amida e hidroxilo) de sus precursores; por lo tanto, tienen la capacidad de unirse con iones metálicos, lo que resulta en la atenuación de su luminiscencia a través del mecanismo de transferencia de electrones del estado excitado [74]. Por lo tanto, los Cdots se han utilizado como sondas fluorescentes para detectar algunos cationes metálicos (Hg^{2+} , Fe^{3+} , Ag^+ , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Sn^{2+}) y biomoléculas (L-Cys, hemoglobina, GSH), entre otros analitos [29, 80]. La luminiscencia de los Cdots puede ser atenuada de manera eficiente tanto por aceptores como por donores de electrones en disolución lo que señala que los Cdots fotoexcitados son buenos aceptores y donores de electrones y, por tanto, buenos reactivos basados en atenuación [51,81-84]. Hasta la fecha, se han desarrollado varios métodos para la síntesis de Cdots, como es la ablación con láser, la descarga de arco, la liberación o exfoliación electroquímica, la oxidación química o electroquímica, la deshidratación térmica, la irradiación con haz de protones, la combustión, el tratamiento por ultrasonidos, reflujo en ácidos y varios métodos con microondas [40, 52, 58, 70, 76]. En la última década, se han explorado una variedad de enfoques para fabricar Cdots, que generalmente se pueden clasificar en dos grupos principales, según los cambios de tamaño que ocurren en el material precursor antes y después de la reacción: métodos *top-down* o *bottom-up* [52, 55, 57]. Los materiales precursores se convierten en Cdots usando condiciones oxidantes a temperatura ambiente o usando diversos enfoques que necesitan altas temperaturas, tales como los métodos hidrotermales y de microondas [61]. Los métodos *top-down* implican reducir materiales de carbono macroscópicas, como el grafito, las fibras de carbono o los CNT, en nanopartículas individuales a través de descarga de arco, ablación láser, oxidación (electro)química y el tratamiento con plasma [57, 70]. Los enlaces C=C o C-OH en los materiales de partida pueden oxidarse a grupos carbonilo o carboxilo mediante el uso de ácidos fuertes de carácter oxidante (sulfúrico o nítrico) u otros agentes oxidantes como H_2O_2 , mientras que el material se transforma en nanopartículas. Las condiciones de síntesis complicadas, que requieren tiempo y consumo de energía, el coste elevado de los materiales de partida y/o de la instrumentación, y la dificultad en la preparación de Cdots en grandes cantidades y de alta calidad, suelen ser los problemas encontrados con más frecuencia en los enfoques *top-down* [54]. Por el contrario, los enfoques *bottom-up* han llamado mucho la atención, ya que los procesos sintéticos no crean contaminación y los compuestos de partida pueden reaccionar de manera flexible.

En pocas palabras, los enfoques *bottom-up* llevan a cabo la síntesis de pequeñas moléculas individuales a complejos más grandes por polimerización y el ensamblaje a través de fuerzas secundarias tales como van der Waals y enlaces de hidrógeno [55]. Los enfoques *bottom-up* incluyen la descomposición térmica, la combustión y la deshidratación de precursores moleculares adecuados (como sacáridos, ácidos orgánicos, aminoácidos, polietilenglicol y polietilenimina), la polimerización hidrotermal asistida por microondas, la descomposición sin disolventes, la síntesis solvotermal, la pirólisis en microondas de una disolución de carbohidratos: todos estos enfoques recientemente desarrollados se consideraron vías disponibles debido a que estos métodos tienen ventajas de procedimientos sintéticos simples, bajo costo y amplia tolerancia del precursor [54, 57, 71]. Para ser más específicos, la síntesis basada en calentamiento por microondas utiliza las transiciones internas de rotación de las moléculas precursoras que se acoplan con la radiación electromagnética externa. Por lo tanto, la eficiencia de calentamiento no está relacionada con la conductividad térmica de los precursores. Por lo tanto, en comparación con otros métodos, el tratamiento térmico asistido por microondas ahorra tiempo y energía, e incluso podría evitar reacciones secundarias indeseables o facilitar nuevas rutas de reacción [57]. Generalmente, el QY de fotoluminiscencia de los Cdots obtenidos con estos métodos es muy bajo [42, 71]. En las primeras investigaciones, el tratamiento de Cdots por ácidos o bases fuertes fue necesario para obtener nanopartículas con una intensa fluorescencia [50]. Más tarde, los Cdots fluorescentes se sintetizaron directamente a partir de etanol mediante un método de un solo paso con facilidad. Actualmente, se eligen algunos adecuados precursores moleculares económicos y biocompatibles, con pasivadores superficiales suaves o incluso sin pasivadores para sintetizar Cdots de mejor fotoluminiscencia en un solo paso [52, 73]. De hecho, todos los Cdots obtenidos a partir de los métodos *bottom-up* se pueden considerar como productos de la carbonización incompleta de carbohidratos [50]. La última tendencia se ha centrado en un proceso “verde” para preparar Cdots mediante la carbonización de biomasa natural, tal como los posos del café, hierba, cáscara de sandía y el zumo de naranja, como fuente de carbono [57, 58, 61, 70, 74]. Entre todas esas metodologías de síntesis, la carbonización hidrotermal es el método más simple y económico para preparar Cdots funcionalizados en un solo paso a partir de numerosos precursores debido a su bajo precio, eficiencia energética y fácil tratamiento posterior [40, 44, 56, 58, 68]. El desarrollo de Cdots para el análisis (bio)químico ha tenido un inicio relativamente tardío en comparación con sus aplicaciones intensivas en bioimagen, y a los aún anteriores estudios centrados en sistemas de determinación de iones metálicos.

Sin embargo, al aprovechar todas las ventajas de las propiedades únicas de los Cdots, los sensores ópticos basados en ellos han logrado un progreso rápido en los últimos años [43]. Se han publicado en la literatura métodos eficientes que permiten la producción de Cdots a gran escala a partir de recursos de carbono baratos [26]. Aunque estos Cdots fluorescentes se pueden obtener a partir de materias primas “verdes”, la mayoría de ellos tienen luminiscencia azul y la banda principal de emisión de fluorescencia se centra en 410-440 nm. Esto es desfavorable para la detección óptica y la obtención de imágenes de muestras biológicas debido a su fluorescencia intrínseca en esta región, mientras que el QY de fluorescencia de los Cdots luminiscentes de la región de longitud de onda larga generalmente no es lo suficientemente alto (a menudo menor del 3%) para las aplicaciones científicas de tipo biológico [70]. Aunque se haya señalado el hecho de que las moléculas reactivas que contienen grupos -OH, -COOH y -NH₂ dan lugar a Cdots con una alta fotoluminiscencia, la relación entre las estructuras de las moléculas reactivas y las propiedades físico-químicas de los Cdots aún no está clara [85]. Para controlar las propiedades fisicoquímicas de los Cdots, se realiza la pasivación y la funcionalización de la superficie, generalmente mediante reactivos de pasivación superficial [42, 58]. Sin embargo, la pasivación puede ser automática, cuando los Cdots se sintetizan mediante carbonización hidrotérmal a alta temperatura o asistida por microondas con diferentes precursores de carbono [58, 74]. Los QY máximos de los Cdots han alcanzado el 35% en comparación con el sulfato de quinina [29]. Ahora es ampliamente reconocido que el estado de la superficie de los Cdots desempeña un papel clave en el incremento de su fluorescencia. Desde este punto de vista, la química de superficie de las nanopartículas (funcionalidad exterior) controla su comportamiento hacia el entorno exterior y puede conducir a un comportamiento predecible en interfaces biológicas [46]. Lo interesante de los Cdots es que, dependiendo de la fuente y el procedimiento utilizado para su síntesis, los grupos funcionales en su superficie se pueden ajustar [62, 64]. Entonces, tanto la introducción como el enriquecimiento de grupos químicos específicos en la superficie de los Cdots puede ser una forma fácil de mejorar la fotoluminiscencia [5]. Sin embargo, la modificación de la superficie de los Cdots con polímeros o pequeñas moléculas orgánicas suele ser complicada debido a que no todos los Cdots tienen grupos reactivos en la superficie. Además, la unión covalente es el método habitual para unir moléculas funcionales a la superficie de los Cdots hidrófilos, lo que puede comprometer en gran medida las propiedades de fluorescencia de los Cdots [64]. No hay que olvidar la purificación inevitable de los Cdots funcionalizados resultantes [66].

Para mejorar el QY de los Cdots y conseguir nanopartículas muy luminiscentes, han sido reportados muchos métodos, tales como la adición de diferentes fuentes de nitrógeno. El dopado con nitrógeno permite también mejorar la sensibilidad y selectividad de los Cdots [52, 80]. Incluso se puede afirmar que el dopado con nitrógeno es crucial para la formación de Cdots con alta fotoluminiscencia [85]. Los Cdots dopados con nitrógeno (N-Cdots) han recibido mucha atención debido a sus propiedades y aplicaciones específicas, una de las cuales es la fotoluminiscencia altamente potenciada. Los métodos más comunes para la síntesis de Cdots/N-Cdots son la oxidación química, la síntesis ultrasónica, la carbonización hidrotérmal, la síntesis solvotérmal, la síntesis en microondas y la ablación con láser. De estos, la carbonización hidrotérmal es uno de los métodos más sencillos. Ha demostrado ser una ruta química ecológica, simple, asequible y blanda para la síntesis de Cdots/N-Cdots en medios acuosos, que puede proporcionar excelentes sondas fluorescentes para aplicaciones en bioimagen [72].

La síntesis de Cdots dopados con nitrógeno se puede clasificar en tres categorías según las fuentes de nitrógeno usadas:

- 1) A partir de pequeñas moléculas orgánicas, tales como levodopa (L-DOPA), citrato de amonio, N, N-dimetilformamida (DMF), urea o aminoácidos.
- 2) A partir de moléculas inorgánicas, tales como NaNH_2 y amoníaco acuoso.
- 3) A partir de fuentes naturales, tales como zumo de fresa, hierba o seda natural [54].

Además, se ha reportado el uso del ácido cítrico (AC) como fuente de carbono para producir Cdots con una alta fotoluminiscencia [50, 79]. Efectivamente, es bien sabido que los quelatos metálicos poseen alta estabilidad térmica por sus anillos similares a los anillos aromáticos, y se ha demostrado que los grupos funcionales del AC, tales como grupos hidroxilo y carboxilo, podrían protegerse por quelación en el proceso de la reacción química. Así, la quelación del AC por parte de iones metálicos divalentes (por ejemplo, Mg, Zn y Ti) puede proteger sus grupos carboxilo durante el proceso de deshidratación y carbonización, así como pueden actuar como donores o aceptores de electrones para mejorar la fotoluminiscencia global [55]. Aun así, el dopado con heteroátomos, tales como N, S, P, B y F, especialmente el dopado o el co-dopado con nitrógeno se ha considerado como un enfoque más efectivo para cambiar la banda prohibida, evitar la auto-atenuación, ajustar las propiedades ópticas y

eléctricas, y también mejorar la actividad química para aplicaciones prácticas [42, 55, 66, 68, 70].

En este sentido, ha sido reportada una doble estrategia de dopado, para obtener Cdots con una fotoluminiscencia mucho más intensa: el uso de hidróxido de magnesio como agente de quelación combinado con un agente de pasivación de nitrógeno [50, 55]. Al emplear estos métodos, el QY de los Cdots puede alcanzar valores tan altos como el 83%, que es comparable al QY presentado por los Qdots. Es digno de mención también que se obtiene un QY extremadamente alto, del 94 %, mediante pirólisis de AC y junto con etilendiamina (EDA) en un autoclave [85]. Sin embargo, la producción de Cdots con una alta fotoluminiscencia generalmente requiere condiciones de reacción intensas o tiempos de reacción largos, lo que no es ventajoso para la producción masiva de Cdots [55]. Igualmente, la síntesis de Cdots dopados puede presentar inconvenientes como necesidad de alta temperatura y un tiempo prolongado de reacción [42]. Una de las principales desventajas de los Cdots dopados con nitrógeno es su banda principal de emisión de fluorescencia centrado en la región de longitud de onda corta [70]. Por otro lado, la quiralidad existe también en las estructuras nanoscópicas. Sin embargo, pocas investigaciones basadas en la quiralidad de los Cdots han sido reportadas. Las propiedades quirales en Cdots aumentan aún más su versatilidad, lo cual es extremadamente importante tanto desde el punto de vista fundamental como tecnológico. Los Cdots quirales, es decir los Cdots levógiros (L-Cdots) o dextrógiros (D-Cdots), podrían presentar una buena capacidad de reconocimiento enantioselectivo [67].

2. Utilidad de los Cdots en sensores químicos

Los Cdots, que como hemos visto son una clase de nanopartículas basadas en carbono con un tamaño inferior a 10 nm, constituyen una plataforma analítica útil debido a su biocompatibilidad y una citotoxicidad potencialmente menor en comparación con los convencionales Qdots; además hay que destacar que su falta de *blinking* les proporciona una ventaja significativa sobre los Qdots desde el punto de vista de las propiedades luminiscentes [86, 87]. Es importante destacar que las propiedades luminiscentes de los Cdots son altamente sensibles a su entorno, y esta característica ha proporcionado oportunidades para diversas aplicaciones de detección. Su excelente solubilidad en agua permite el empleo de Cdots para detección en disoluciones acuosas [51, 69, 86].

Hasta la fecha, los Cdots han sido usados en muchas áreas: bioimagen, tratamiento fotodinámico del cáncer, catálisis, administración de fármacos, dispositivos optoelectrónicos y sobre todo la detección opto/electroquímica en (bio)sensores [14]. Además, como fue señalado anteriormente, la modificación de la superficie puede dotar a los Cdots de más funciones y, en consecuencia, ampliar sus aplicaciones [86]. Debido al hecho de que los Cdots generalmente no muestran una fluorescencia adecuada, es de interés creciente el desarrollo de enfoques indirectos para usar estos nanomateriales como sondas fluorescentes. Por ejemplo, el primer enfoque publicado basado en Cdots para la detección rápida y selectiva de GSH en un solo paso se basa en el uso de nanocompuestos Cdots-MnO₂ [28]. Los sensores basados en Cdots tienen varias ventajas, tales como alta sensibilidad hacia diversos analitos diana, detección simple y sin necesidad de más reactivos y un cambio muy rápido de la señal de fluorescencia, lo que permite un tiempo de respuesta muy corto [62]. Hasta ahora, la mayoría de los (bio)sensores de este tipo se basan en el *quenching* de la fluorescencia de los Cdots activado por los analitos [69]. Sin embargo, estos sensores ópticos “apagables” (*turn-off*) son vulnerables a las interferencias por ligandos o incluso disolventes, lo que lleva a falsos positivos. Esto puede afectar a la selectividad de la detección. Por ello, los sensores “de encendido” (*turn-on*) suelen preferirse a los sensores *turn-off* debido a su mayor sensibilidad de detección [69]. A continuación, se comentarán los fundamentos de la luminiscencia, las similitudes y diferencias entre tipos de luminiscencia (desde la fluorescencia a la fosforescencia, pasando por la fluorescencia de tiempo de vida) y el impacto práctico que están teniendo los Cdots hasta la fecha, especialmente en la metodología analítica. Los Cdots pueden ser usados para la detección (bio)química, electroquimioluminiscente o fotoelectroquímica. Entre las aplicaciones biomédicas de los Cdots, es de interés su uso en la bioimagen y en el tratamiento del cáncer.

2.1. Fundamentos de luminiscencia

Los Cdots son buenos donores de energía y se pueden emplear con facilidad en ciertos tipos de transferencia de energía en presencia de aceptores adecuados [59]. La luminiscencia es un fenómeno que ocurre por transferencia de energía y se manifiesta mediante emisión de luz. Uno de los casos más conocidos es el de la luz emitida por las luciérnagas o por organismos abisales.

Dependiendo de la energía que la origine, es posible hablar de varias clases de luminiscencia: fotoluminiscencia, fluorescencia, fosforescencia, termoluminiscencia, quimioluminiscencia, triboluminiscencia, electroluminiscencia y radioluminiscencia. Cuando la energía de excitación es de origen electromagnético (rayos X, ultravioleta, catódicos) se habla de fotoluminiscencia. Los rayos X, en particular, producen una intensa luminiscencia. En el caso de los materiales fotoluminiscentes, la luz es absorbida durante un determinado periodo de tiempo y, al ser emitida, lo hace con una longitud de onda mayor de la radiación incidente, esto es, con menor energía. Es decir, no se trata de un fenómeno óptico de difracción o reflexión. En el caso de los Cdots la identidad química del heteroátomo dopante influye en la distribución de electrones dentro de los Cdots, alterando la energía de banda prohibida y mejorando así su fotoluminiscencia [57]. La fluorescencia es la luminiscencia causada única y exclusivamente por radiación ultravioleta (UV). El término fluorescencia proviene en su origen del mineral que presenta este fenómeno por naturaleza, la fluorita. No todos los materiales absorben luz UV de igual longitud de onda. Por ejemplo, algunos sólo son capaces de hacerlo para rayos UV de longitud de onda corta (254 nm); otros, para longitudes de onda largas (350-370 nm), mientras que existen materiales que presentan este fenómeno indistintamente para unas y otras longitudes. Tampoco todos los materiales, aunque tengan el mismo origen o la misma apariencia, poseen propiedades fluorescentes. Gran mayoría de los sensores fluorescentes se basan en FRET, un proceso no radiativo dependiente de la distancia, mediante el cual un donador de estado excitado (generalmente un fluoróforo) transfiere su energía a un aceptor situado a una proximidad cercana de 1-10 nm en estado fundamental a través de interacciones dipolo-dipolo de largo alcance [10, 29, 59]. Dicha plataforma de detección basada en FRET normalmente contiene una sonda marcada con un fluoróforo y un inhibidor para formar un par donador-receptor. Cuando la banda de absorción del inhibidor se solapa con la banda de emisión fluorescente del donador, la atenuación rápida inducida por FRET ocurre de forma efectiva [73, 77]. En los sistemas FRET convencionales, es habitual el empleo de colorantes fluorescentes tanto como donadores de energía que como aceptores, debido a su pequeño tamaño, intensidad de fluorescencia relativamente alta y su disponibilidad comercial para diversos inmunoensayos [40]. Sin embargo, hay que considerar que tales sistemas FRET presentan inconvenientes tales como fotoblanqueo, interferencias y sobre todo la síntesis compleja de los fluoróforos, tanto los donadores como los aceptores [29, 40].

En los últimos años, han sido desarrollados varios sistemas FRET basados en nanomateriales. En estos sistemas, los nanomateriales luminiscentes como los Qdots, las nanopartículas de sílice dopadas con colorantes, las UCNPs y las microesferas marcadas con colorante podrían aplicarse como donores alternativos a los colorantes fluorescentes [10, 40]. Además, las nanopartículas de metales nobles, esto es AuNPs y AgNPs, pueden ser usadas para preparar plataformas sensoras basadas en FRET con la mayoría de los fluoróforos, en las que estos últimos sirven como donores de energía y las nanopartículas de metales nobles comoceptoras, debido a su alto coeficiente de absorptividad molar ($10^9 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ o más) o bien usar la amplia banda de absorción que se superpone con la emisión de los Cdots [27, 88]. Algunos nanomateriales, como los Qdots semiconductores que se utilizan habitualmente como donores de energía en los sistemas FRET, adolecen de un complicado proceso de preparación y una alta toxicidad. Por lo tanto, es necesario encontrar una alternativa más segura y sencilla a los Qdots con propiedades fluorescentes comparables. Los Cdots parecen ser una alternativa prometedora a los Qdots semiconductores debido a su baja toxicidad, alta estabilidad química y bajo riesgo ambiental. La atenuación eficiente de la fluorescencia por transferencia de energía entre el emisor 0D y los absorbentes 2D aumenta el interés por la detección óptica [77]. Se han realizado esfuerzos para aplicar plataformas sensoras basadas en FRET para la detección sensible de diversos analitos como el H_2O_2 y los plaguicidas organofosforados (OP) [73]. En el sistema FRET basado en Cdots con detección ratiométrica, esas nanopartículas de carbono no sólo sirven como donores de energía, sino también como sitio de anclaje para la sonda orgánica que desempeña el papel de elemento de reconocimiento específico y como generador de señal de respuesta [86]. Aparte de la luminiscencia convencional de tipo *down-conversion*, en los últimos años han sido reportadas investigaciones sobre la luminiscencia *up-conversion* de los Cdots. La emisión de luminiscencia de tipo *up-conversion* es un fenómeno óptico interesante en el que la longitud de onda de emisión es más corta que su longitud de onda de excitación, que puede ser particularmente adecuada para la detección y la obtención de imágenes en muestras biológicas. Cuando se excita con un láser pulsado de femtosegundos con una longitud de onda en la región NIR (con baja energía y penetración profunda), la luminiscencia de conversión ascendente también se denomina fluorescencia de dos fotones (TPF), cuyo uso en muestras biológicas puede evitar la auto-fluorescencia potencial y la fluorescencia de fondo de las especies biológicas, permitiendo una detección sensible y bioimágenes de alta resolución.

Desde el año 2007, cuando fue descubierta por primera vez la TPF en Cdots, numerosas investigaciones se refirieron a ella debido a sus propiedades ópticas únicas y amplias aplicaciones. Durante la última década, la literatura sobre la TPF o la fluorescencia *up-conversion* de los Cdots se centró principalmente en las imágenes celulares. Hasta ahora, sólo un par de artículos se han referido a TPF de Cdots para la detección de iones y moléculas [53]. Fenómenos tales como el fuerte efecto de filtro interno (IFE) debido a interacciones moleculares que incluyen las de tipo electrostático, el apilamiento π - π , y puentes de hidrógeno permiten el *quenching* de la fluorescencia de los Cdots codopados con nitrógeno y azufre (N,S-Cdots) con alta eficiencia por parte del fungicida fluazinam [66]. Entre la mayoría de las estrategias de detección basadas en Cdots, la intensidad de fluorescencia creciente o decreciente generalmente se define como la señal que responde a la modificación de la concentración del analito [86]. En general, los Cdots dopados con heteroátomos exhiben propiedades ópticas mejores en comparación con los Cdots no dopados, tales como un mayor QY y tiempos de vida de fluorescencia más largos, especialmente cuando se usó la estrategia de funcionalización [57]. La fosforimetría presenta una serie de ventajas analíticas frente a la fluorimetría, entre las que se pueden destacar la sensibilidad, la linealidad de la respuesta y, especialmente, la selectividad. Dewar en 1894 logró medir las señales fosforimétricas a partir de disoluciones subenfriadas. Se trató de la metodología llamada fosforescencia a baja temperatura (LTP). Sin embargo, debido a sus muchas desventajas, todas ellas relacionadas con la necesidad de trabajar en condiciones criogénicas, y al progresivo desarrollo de la fosforescencia a temperatura ambiente (RTP) a partir del 1967, la LTP no suele ser utilizada en los trabajos publicados a partir de 1975 [89]. Los diferentes métodos de detección fosforimétrica de tipo RTP atrajeron mucha atención debido a sus ventajas, como la mayor diferencia entre los espectros de excitación y emisión, la mayor duración de las emisiones, la ausencia de interferencias por autoemisión (hecho que puede ocurrir en fluorescencia) y por la luz dispersada de la matriz. Por ejemplo, ha sido reportado un método de detección RTP basado en atenuación de la fosforescencia de Qdots de ZnS dopadas con Mn por parte de varios analitos, tales como heparina, glucosa, enoxacina y curcumina [41]. Con respecto a la termoluminiscencia, esta se presenta únicamente cuando ciertos materiales se han calentado a temperaturas por debajo del rojo, siendo el calor el desencadenante de la emisión. La luz visible generada es inicialmente débil, acentuándose entre los 50 y 100 °C y cesando su emisión a partir de los 475 °C.

Ciertos materiales no metálicos y fácilmente exfoliables poseen la propiedad de emitir luz cuando son sometidos a acciones mecánicas, por ejemplo, al ser molidos o rayados. Es el fenómeno de la triboluminiscencia. Si el efecto es provocado por la acción de corrientes eléctricas, el fenómeno se denomina electroluminiscencia. La radioluminiscencia, por su parte, está motivada por reacciones nucleares. Fue observada por vez primera en el radio, gracias a las investigaciones de Marie y Pierre Curie. Debido a la complejidad de los productos de síntesis y consecuentemente a las indeterminadas estructuras químicas, hay debates en curso sobre los orígenes de las propiedades luminiscentes de los Cdots. La emisión dependiente de la longitud de onda es una propiedad intrínseca de los Cdots que ha sido ampliamente estudiada y reportada. Aunque el origen de sus propiedades de emisión todavía no se ha justificado completamente, se cree que el origen de la fuerte luminiscencia de los Cdots deriva de los defectos en su superficie. Estos defectos pueden atribuirse a la presencia de dominios hibridados sp^2 y sp^3 . Mecánicamente, las emisiones de luminiscencia en los Cdots se atribuyen a la recombinación radiativa de los electrones atrapados y los agujeros en la superficie, donde su gran superficie (respecto al volumen de partículas) y los diferentes sitios de atrapamiento de energía superficial en los pequeños Cdots se pueden estabilizar mediante agentes de pasivación de la superficie [5]. La luminiscencia de los Cdots se origina también por trampas de energía emisiva en la superficie, confinamiento cuántico y grupos funcionales de superficie [59]. Identificar la composición y determinar las estructuras químicas relacionadas es esencial para resolver los orígenes de la luminiscencia de los Cdots. Hasta ahora, los Cdots basados en AC se consideraron generalmente como nanopartículas carbonosas, cuyas fuertes propiedades luminiscentes se pueden atribuir a los núcleos carbonáceos o las composiciones complejas de los núcleos de carbono y fluoróforos orgánicos. Hay estudios sistemáticos que demuestran que la formación de dos fluoróforos orgánicos durante el proceso de carbonización, como son el ácido 5-oxo-3,5-dihidro-2H-tiazol [3,2-a] piridin-3,7-dicarboxílico (TPDCA) y el ácido 5-oxo-3,5-dihidro-2H-tiazol [3,2-a] piridin-7-carboxílico (TPCA), son el principal origen real de la fluorescencia de N,S-Cdots a partir de AC fuertemente fluorescentes y con un QY notable. Los fluoróforos orgánicos podrían ser también al origen de la luminiscencia de otros tipos de Cdots con altos QY.

Esta hipótesis estaría respaldada por los siguientes fenómenos:

- Esos Cdots fueron sintetizados a bajas temperaturas (≤ 200 °C) en sistemas acuosos, lo que permite que los compuestos orgánicos pueden estar presentes.

- Sus QY disminuyen al aumentar la temperatura de síntesis, debido a la carbonización de compuestos orgánicos, sugiriendo de nuevo que los compuestos orgánicos contribuyen a los altos QY de fluorescencia.
- Esos Cdots exhiben un fotoblanqueo intenso que es similar al de los fluoróforos orgánicos, lo que implica que pueden no ser nanomateriales carbonosos de naturaleza.
- Los contenidos en carbono en esos Cdots son bajos (~50%), mientras que las relaciones molares de los heteroátomos ($X = H, O, N, S$ y otros) *versus* carbono (X/C) son bastante altas (1,10-3,41).

Por lo tanto, no se puede dar por sentado que los Cdots por sí sean nanomateriales luminiscentes [79].

2.2. Similitudes y diferencias entre tipos de luminiscencia

La luminiscencia es un proceso de emisión de luz por un material cuyo origen no se debe de forma exclusiva a una alta temperatura, es una forma de “luz fría” cuya emisión es provocada en condiciones de temperatura ambiente o incluso más baja. Cuando un material recibe energía procedente de una radiación, ésta es absorbida por su estructura electrónica y posteriormente es emitida cuando los electrones vuelven a su estado original. En función de la radiación que estimula la emisión de luz, tendremos los siguientes procesos luminiscentes: radioluminiscencia o fotoluminiscencia. La fotoluminiscencia es activada por una radiación de origen electromagnético: radiación UV, rayos X o rayos catódicos. En este último caso, se habla más propiamente de catodoluminiscencia, que se basa en un bombardeo con electrones acelerados. La emisión de luz ocurre durante un tiempo característico (τ) después de la absorción de la radiación y es este parámetro el que permite clasificar la luminiscencia en fluorescencia y fosforescencia. La primera se restringe a la luminiscencia causada por rayos UV y se caracteriza por tener τ inferior a 0,00000001 segundos (10^{-8} segundos); mientras que la fosforescencia perdura una vez cortada la excitación. Se considera fosforescencia si τ supera los 10^{-8} segundos. Existen materiales que, a pesar de haber retirado la fuente energética que incide sobre ellos, continúan emitiendo luz durante una fracción de tiempo, por lo que es difícil a veces diferenciar los fenómenos de fosforescencia y fluorescencia.

La diferencia entre ambas, desde el punto de vista de su fundamento físico-químico, son las transiciones electrónicas implicadas en la emisión (S_1-S_0 en el caso de la fluorescencia y T_1-S_0 en el caso de la fosforescencia). Han sido reportados Cdots que muestran una emisión de doble banda. Estos Cdots emiten a longitudes de onda de 382 nm y 538 nm, siendo excitadas a las longitudes de 320 nm y 420 nm, respectivamente. Sin embargo, bajo una excitación de 365 nm, estos Cdots muestran picos de emisión bien resueltos a 435 nm y 538 nm. El pico de emisión a 435 nm muestra una dependencia con la longitud de onda de excitación, mientras que el pico de emisión a 538 nm es independiente de la longitud de onda de excitación. La longitud de onda de emisión de 538 nm en estos Cdots se debe a la formación de estados moleculares que contienen grupos funcionales oxigenados de doble enlace (CO y COOH) en la superficie. La emisión azul se debe a los diversos estados superficiales que contienen grupos funcionales de oxígeno tanto de enlace simple como doble en la superficie de los Cdots. La competencia entre diferentes centros de emisión y trampas no radiativas debido a los diversos grupos funcionales contribuye a las propiedades fluorescentes de los Cdots [61].

2.3. Impacto práctico de los Cdots

Los Cdots están teniendo aplicaciones en diversos campos, tales como bioimagen, catálisis, dispositivos fotovoltaicos, diagnósticos médicos, quimioluminiscencia y detección por fluorescencia. En particular, los Cdots ofrecen una alternativa a los colorantes orgánicos y los Qdots como elementos de detección en (bio)sensores ópticos y bioimagen debido principalmente a su preparación sencilla, alta fotoestabilidad y excelente biocompatibilidad [5, 40, 45, 54, 57, 59, 61, 68, 72, 76, 90, 91]. Debido a las muchas propiedades ventajosas de los Cdots, han sido empleados en muchos (bio)sensores, entre otros para la detección de iones metálicos [5, 45, 54, 73]. También se han usado en la detección en muestras reales de varios otros analitos, tales como glucosa, ácido desoxirribonucleico (ADN), proteínas *in vitro*, CO_2 , sulfuros, OP, melamina, bifenilos polibromados, glutatión (GSH), cisteína y tetraciclinas [27, 45, 54, 73, 76, 77]. Dada su creciente importancia en nanomedicina, los Cdots fueron empleados con éxito en la administración dirigida de fármacos [5, 40, 59, 61, 68]. Las aplicaciones catalíticas de los Cdots incluyen la fotorreducción de metales y oxígeno [5, 54, 59, 68, 90]. Los Cdots se han integrado con éxito en semiconductores para mejorar su actividad fotocatalítica, disminuyendo los eventos de recombinación de electrodos y ampliando la región de fotoabsorción.

La estructura 1T conjugada de los Cdots puede mejorar la interactividad entre los Cdots y los semiconductores, lo que da como resultado un compuesto estable. Recientemente, los Cdots modificados con g-CNQdots fueron usados como eficientes fotocatalizadores para la preparación de H₂, así como para la degradación de naranja de metilo, rodamina B (RhB), tetraciclina y fenol [60]. Por otra parte, ha sido ampliamente reportada la utilización de Cdots en dispositivos optoelectrónicos [5, 59, 68, 90]. Los Cdots tienen aplicaciones prometedoras para la fabricación de diodos emisores de luz (LED) [54, 61, 76]. Recientemente, para evitar la atenuación de la fluorescencia en estado sólido, se ha propuesto dispersar los Cdots en matrices transparentes, tales como silicona, resinas epoxi, poli (metacrilato de metilo), polivinilpirrolidona, polidimetilsiloxano y en alcohol polivinílico (PVA) [44]. Los Cdots tienen aplicaciones potenciales en los campos de la conservación de energía, como en los dispositivos de conversión/almacenamiento de energía [54, 61]. Un tipo de Cdots en forma de gel (G-Cdots) ha sido usado como componente de una tinta invisible para las impresoras, que mostró la aplicabilidad de esos G-Cdots en la vida cotidiana y en las actividades militares [55]. Hasta ahora, la mayoría de las investigaciones sobre Cdots se han centrado principalmente en su síntesis y aplicaciones, mientras que sólo unos pocos estudios han abordado sus posibles consecuencias ambientales, y mucho menos, el impacto comparativo de los Cdots modificados/dopados. Para evaluar su verdadero potencial, es necesario caracterizar la fotoluminiscencia de los Cdots en paralelo con una evaluación de su toxicidad lo que es relevante para la posible liberación de Cdots en el ecosistema. Se probó la toxicidad de estos Cdots en las células bacterianas utilizando *Shewanella oneidensis* MR-1 como microorganismo modelo. Curiosamente, los Cdots no mostraron toxicidad en la mayoría de los casos, y de hecho facilitaron el crecimiento de bacterias [57]. Los Cdots funcionalizados se utilizaron también para la detección selectiva de *Escherichia coli* [87].

2.3.1. Metodologías analíticas

Un aspecto importante de la química de los Cdots en el contexto de las aplicaciones de detección es la observación de que estas nanopartículas conservan la “memoria estructural” de los precursores carbonosos, dotando efectivamente a los Cdots con capacidades de reconocimiento molecular sobre la base de unidades funcionales de las moléculas precursoras. Esta notable característica se empleó para diseñar variadas modalidades de detección basadas en Cdots [56].

Como se ha señalado anteriormente, las metodologías analíticas que han empleado Cdots como herramienta de detección en esta Tesis Doctoral han tratado de aprovechar sus propiedades luminiscentes. Por lo tanto, sólo se reportarán ahora los tipos de detección más pertinentes con la luminiscencia, según el trabajo experimental desarrollado y descrito en la Tesis Doctoral, y los antecedentes presentes en la literatura de este ámbito de investigación al respecto: la detección (bio)química, de tipo electroquimioluminiscente y la detección fotoelectroquímica.

2.3.1.1. Detección (bio)química

De forma similar a los Qdots, se ha prestado gran atención a la aplicación analítica de los Cdots. Sin embargo, la intensidad de luminiscencia de los Cdots es normalmente más estable frente a los cambios del entorno químico/físico tales como el pH, la fuerza iónica o incluso la presencia de otras especies químicas. Hasta el momento, fueron reportadas sólo algunas determinaciones directas de analitos mediante Cdots. El método de detección indirecta suele ser la forma más adecuada de emplear la ventaja única de estos nanomateriales como sondas luminiscentes para detectar especies químicas que no tienen un efecto directo sobre su fluorescencia y/o fosforescencia [65]. Los Cdots sintetizados a partir de D-glucosa y espermina fueron capaces de inducir la transición del ADN de la forma B a la forma Z bajo condiciones salinas fisiológicas, lo que sugirió la fabricación de un (bio)sensor simple para la detección de los daños estructurales del ADN, cambios que suelen ser producidos por la radiación [46]. Los Cdots fueron usados en algunos inmunoensayos: como marcadores fluorescentes para la detección de inmunoglobulinas humanas o antígeno p24; en combinación con aptámeros para la detección de *Salmonella typhimurium*; en un ensayo por inmunoabsorción para la detección de la alfa-fetoproteína humana (AFP); también conjugados con estreptavidina para la detección de diferentes dianas además del antígeno p24 [40].

2.3.1.2. Detección electroquimioluminiscente

Los Cdots han recibido mucha atención debido también a sus propiedades de almacenamiento y transferencia rápida de electrones, sobre las que se basó el complejo CQdots/MoS₂ usado como catalizador de la reacción de formación de hidrógeno (HER) [92]. Se ha descrito también una plataforma de detección electroquímica sensible utilizando el nanocompuesto WP6-N-CQdots para la modificación de un electrodo para la detección de trinitrotolueno (TNT). El GCE modificado con WP6-N-CQdots ha permitido una buena detección electroquímica. Se obtuvieron dos rangos lineales de 0,0010 a 1,0 μM y de 1,0 a 20,0 μM, con un límite de detección de 0,95 nM (S/N=3). La técnica de detección electroquímica desarrollada se ha aplicado con éxito para la detección de TNT en muestras de agua de lago [14]. También ha sido reportado que un nanocompuesto de Cdots y poli(orto-aminofenol) ha sido usado como sensor amperométrico para la determinación de yodato [11].

2.3.1.3. Detección fotoelectroquímica

Se ha descrito que los Cdots permiten la reducción directa de Ag⁺ a plata elemental (Ag⁰) formando AgNPs espontáneamente. El exceso de Cdots consume el ion Ag⁺ libre en disolución, al unirse Ag⁺ con grupos funcionales en la superficie de los Cdots y, por lo tanto, inhibe el crecimiento de las AgNPs. Los biotioles pueden coordinarse con Ag⁺ a través de los grupos tiol, y luego, el complejo Ag⁺-biotiol libera gradualmente Ag⁺ para permitir su reducción mediante los Cdots y así facilitar el crecimiento de AgNPs en la superficie de los Cdots. De este modo, se ha desarrollado un procedimiento colorimétrico para la detección rápida de biotioles basados en la absorción del plasmón de las AgNPs [91]. También se ha descrito una ruta novedosa y fácil para la síntesis de Cdots 0D y láminas de carbono 2D parecidas a grafeno, que se basa en la carbonización directa de pequeñas moléculas orgánicas en fase líquida empleando un líquido iónico como disolvente. El material de carbono preparado como tal presenta, una dispersabilidad excelente en disolventes comunes, una fácil capacidad de formación de películas y una buena actividad fotoelectroquímica. También se ha explorado el efecto sinérgico de Cdots y láminas de carbono para la generación y el transporte de cargas electrónicas con un rendimiento fotovoltaico mejorado [71].

2.3.2. Aplicaciones biomédicas

Los Cdots se han usado en muchas aplicaciones biomédicas, donde han demostrado un alto potencial para el diagnóstico de enfermedades relacionadas con niveles anómalos de varios analitos, por lo que podrían ser usados como biomarcadores [91]. Entre estos compuestos están los btiotioles, tales como GSH y Cys. Algunos ejemplos: un quimiosensor para medir el contenido de GSH de sangre humana total logró resultados consistentes con los del método clásico de Ellman [26]. Además, se demostró que en presencia de Cys se reducía la eficiencia de FRET del sistema Cdots-AgNPs y se restauraba la intensidad de fluorescencia de los Cdots. Sobre la base de este hallazgo, se desarrolló un método de “encendido” de la fluorescencia para la determinación selectiva de niveles nanomolares de Cys en plasma humano y muestras de orina: un método simple y selectivo para la determinación de Cys en el rango de concentración de 6,0 a 300 nM, con un límite de detección de 4,0 nM [27]. Una de las aplicaciones más atractivas de los Cdots en el campo de la detección química es la detección de iones metálicos. El desequilibrio de hierro se relaciona con diversos trastornos, como anemia, enfermedad de Alzheimer y hemocromatosis, y puede servir como un estímulo biológico para que hongos comensales, tales como *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans*, se conviertan en patógenos más virulentos y causen infecciones secundarias [72]. Se ha reportado que la aplicación de sondas fluorescentes, observadas mediante un microscopio de fluorescencia, puede proporcionar información sobre las reservas celulares de iones metálicos y sus respuestas a cambios en los estímulos biológicos. El alto contenido de nitrógeno y oxígeno en la superficie de los N-Cdots justifica su alta afinidad con Fe^{3+} originándose una fuerte atenuación de la intensidad de fluorescencia de los N-Cdots. [72]. A continuación, se comentarán las aplicaciones que los Cdots tienen en propósitos biológicos, tales como bioimagen y el tratamiento del cáncer.

2.3.2.1. Bioimagen

Con el término bioimagen se hace referencia a la observación con diferentes técnicas de microscopía de material biológico, sobre todo células o partes de ellas. Por ejemplo, los Cdots pueden infiltrarse en las células y gracias a sus propiedades luminiscentes permiten visualizarlas.

Los Cdots abren una nueva vía para la obtención de imágenes de fluorescencia debido a sus importantes propiedades físicas y químicas, tales como longitud de emisión sintonizable, alta estabilidad, solubilidad en agua, biocompatibilidad y baja toxicidad. En particular, se ha reportado que algunos Cdots tienen capacidades de autoselección hacia las células cancerosas, lo que supone una gran ventaja sobre otros agentes fluorescentes, porque normalmente los materiales fluorescentes necesitan conjugación adicional con moléculas diana para mejorar la selectividad y el contraste de imágenes en el sitio del tumor. Ha sido reportado también que las nanopartículas de carbono fluorescentes preparadas a partir de una relación molar óptima de D-glucosa/ácido aspártico (7:3) exhiben una alta capacidad de focalización en las células de glioma C6 [93]. La encapsulación de Cdots hidrofóbicos (H-Cdots) por polímeros anfifílicos a través de un sencillo procedimiento de autoensamblaje es un método alternativo al enlace covalente. Por ejemplo, una sonda fluorescente de doble emisión basada en H-Cdots para Cu^{2+} fue preparada encapsulando H-Cdots en micelas formadas por autoensamblaje de los polímeros anfifílicos 1,2-distearoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi (polietilenglicol)-2000] (DSPE-PEG) y DSPE-PEG modificado con tetrakis (4-carboxifenil) porfirina (DSPE-PEG-TCPP), respectivamente. La sonda obtenida se ha usado para obtener imágenes de los cambios del nivel de Cu^{2+} en las células hepáticas HL-7702 y HepG2 con éxito [64]. Un tipo de N-Cdots ha sido evaluado usando microscopía de escaneo confocal de láser como sonda fluorescente para la tinción selectiva de células eucariotas utilizando bioimagen de células de levaduras patógenas [72]. N-Cdots de naturaleza hidrófila y con grupos funcionales (nitrógeno, carbonilo y ácido carboxílico) han favorecido su absorción efectiva en el interior de las células y en la interacción irreversible con el material nuclear, lo que sugirió que se podían utilizar Cdots como potentes sondas fluorescentes *in vitro* para la detección de infecciones fúngicas en muestras biológicas [72]. También se ha reportado que se han utilizado células HeLa para probar la viabilidad de la detección celular de GSH por microscopía de fluorescencia confocal. Se observó una fluorescencia verde brillante en el citoplasma cuando las células HeLa se incubaron con la sonda de Cdots funcionalizados con bis (3-piridilmetil) amina (BMPA-Cdots) durante 30 minutos. Después de tratarse con iones Cu^{2+} , las células casi no mostraron fluorescencia, y luego se observó la consiguiente recuperación de fluorescencia tras la adición de GSH. Otra ruta es la basada en BPMA-Cdots/ Ag^+ , que originó una fluorescencia débil con la sonda sola BPMA-Cdots, y un ulterior aumento de fluorescencia debido a la formación de complejos entre la sonda y los iones Ag^+ . La adición de GSH produjo una atenuación de la fluorescencia [94].

Sin embargo, existen varios inconvenientes en el desarrollo de Cdots fluorescentes como sondas de imágenes ópticas en células vivas. Así, los Cdots con longitudes de onda de emisión largas no siempre pueden alcanzar un QY razonable; la luminiscencia azul o verde que poseen la mayoría de los Cdots con una longitud de onda de emisión corta tiene que superar los problemas de las interferencias de fondo en la creación de imágenes biológicas. Además, la fluorescencia celular relativamente es otro inconveniente para la aplicación de los Cdots en las imágenes de células vivas, aunque se ha reportado que los Cdots pueden cruzar la membrana plasmática y mostrar fluorescencia en las células. Para extender las aplicaciones de los Cdots en bioimagen, se están realizando gran cantidad de intentos y los estudios se han centrado principalmente en la funcionalización de la superficie de los Cdots. Se ha publicado que los ligandos positivos, incluidos polietilenimina (PEI), polietilenglicol (PEG) y organosilanos, se pueden conjugar con los Cdots para aumentar su QY. Teniendo en cuenta que la mayoría de los procedimientos de síntesis son largos y complicados, se están buscando estrategias simplificadas para desarrollar Cdots como sondas fluorescentes para imágenes celulares que podrían prepararse fácilmente en condiciones suaves y para los cuales los reactivos requeridos están fácilmente disponibles. Por ejemplo, los Cdots modificados con arginina (Arg-Cdots) tienen una fuerte luminiscencia y podrían usarse para la obtención de imágenes celulares bajo microscopía de fluorescencia común debido a la alta eficiencia de captación celular. La luminiscencia celular muestra un desplazamiento al rojo cuando los Arg- Cdots entran en las células, y la capacidad de emisión de luminiscencia en el rojo depende de las líneas celulares [45].

2.3.2.2. Tratamiento del cáncer

Los Cdots ofrecen la posibilidad de ser una alternativa útil en el campo de la nanomedicina, en particular en el diagnóstico y en el tratamiento del cáncer. Ya se demostró que los Cdots cumplen dos criterios básicos para su uso clínico: pueden excretarse rápidamente del cuerpo y tienen baja toxicidad, a la vez que producen una señal óptica confiable. El gran área superficial de los Cdots y la disponibilidad de grupos funcionales carboxílicos en la misma permiten la preparación de sondas multimodales y conjugados terapéuticos. Por lo tanto, los Cdots se pueden usar como agentes terapéuticos. En particular, se están usando como fotosensibilizadores para la terapia fotodinámica y para la terapia fototérmica del cáncer.

La terapia fotodinámica (TFD) se ha convertido en una modalidad prometedora para el tratamiento del cáncer, que implica la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en el tejido. Las porfirinas y sus derivados son ampliamente utilizados como fotosensibilizadores para TFD. Los fotosensibilizadores desempeñan un papel crucial en la TFD, que produce ROS para destruir las células tumorales por necrosis y apoptosis cuando se exponen a una longitud de onda de luz adecuada [95]. Sin embargo, la escasa solubilidad en agua y el corto tiempo de circulación en sangre limitan severamente la aplicación de derivados de porfirinas en TFD. Mientras tanto han sido reportados pocos ejemplos de uso de Cdots en TFD, quizás por la dificultad de sintetizar Cdots con actividad fotodinámica intrínseca. Por lo tanto, la síntesis de Cdots que contengan porfirinas con buena solubilidad y tamaños pequeños podría ser una estrategia alternativa para la aplicación de porfirinas. Los Cdots basados en porfirina se han preparado a partir de mono-hidroxifenil-trifenilporfirina y quitosán, que origina oxígeno singlete citotóxico y poseen buena solubilidad en agua. Esos Cdots han mostrado una vez más la importancia de la estructura de las moléculas precursoras en la preparación de Cdots funcionales. Además, han demostrado una actividad fotodinámica efectiva en el tratamiento del tumor, gracias a su buena fotoestabilidad, biocompatibilidad, captación celular y potente citotoxicidad tras la irradiación. Los efectos terapéuticos *in vivo* validaron que los Cdots basados en porfirina pueden suprimir el crecimiento del tumor sólido de manera eficiente [96]. La hipoxia, una característica típica de los tumores sólidos, restringe notablemente la eficacia de la TFD. Un nanocompuesto multifuncional basado en Cdots dopadas con nitruro de carbono para la disociación del agua impulsada por la luz se ha propuesto para resolver este problema. El enfoque basado en la disociación del agua ha mostrado un gran potencial para mejorar el nivel intratumoral de oxígeno y finalmente revertir la resistencia a la TFD desencadenada por la hipoxia y la metástasis tumoral [97]. Varios Cdots con emisión en el NIR demostraron tener un muy buen potencial para aplicaciones en imágenes celulares y terapia fototérmica del cáncer [98, 99]. Esto se debe principalmente a las ventajas de la emisión en el rojo, tales como la baja toxicidad fotoinducida, la capacidad de penetración en los tejidos profundos y la baja interferencia del fondo. Entre estos Cdots, uno de tipo carboxílico con emisión roja presentó una amplia banda de absorción desde la región visible a la NIR (400 nm a 800 nm) y mostró una eficiencia de conversión fototérmica del 38,5% bajo una irradiación con láser a 671 nm ($2 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$). Un nuevo tipo de nanopartículas de carbono (llamado CyCdots) con propiedades teragnósticas intrínsecas fue preparado a partir de un colorante hidrófobo tipo cianina y PEG800 a través de un proceso solvotermal simple.

Una fuerte absorción y emisión en el NIR en el rango de 600 a 900 nm, junto con una absorción preferencial en los tumores y una alta eficiencia de conversión fototérmica ($\eta = 38,7\%$), han facilitado la actuación de CyCdots como agente teragnóstico ideal [99]. Ha sido reportada también la preparación de Cdots co-dopados con azufre y selenio a través de un método hidrotermal que producen emisiones infrarrojas cercanas a la longitud de onda de excitación NIR de los Cdots, con picos a 731 y 820 nm. Esos Cdots exhiben una eficiencia significativa en conversión fototérmica del 58,2%, que es el valor más alto reportado para nanoestructuras de carbono e incluso comparable con las nanoestructuras de oro. Además, los Cdots tienen una gran sección transversal de absorción de dos fotones (30,045 GM), lo que permite emisiones NIR y la conversión fototérmica de los Cdots a través del mecanismo TPE [98]. Estas propiedades extraordinarias proporcionan a los Cdots aplicaciones en imágenes trimodales (imágenes de fluorescencia, imágenes fototérmicas e imágenes fotoacústicas) y en la terapia fototérmica (un régimen de tratamiento que utiliza agentes fototérmicos para transferir energía NIR y erradicar células cancerosas) del cáncer *in vitro* e *in vivo* [98, 99]. También se ha reportado un método simple, barato y ecocompatible para fabricar compuestos de nanopartículas de azul de Prusia (PBNP) decoradas con Cdots (Cdots/PBNP) con una estructura satélite/núcleo. Los Cdots poseen propiedades fotoluminiscentes únicas y biocompatibilidad intrínseca; mientras que las PBNP no son tóxicas y tienen una buena capacidad de conversión fototérmica para el tratamiento del cáncer. Los Cdots/PBNP poseían una fotoluminiscencia de emisión verde y una fotoabsorción en el infrarrojo cercano con una alta eficiencia y estabilidad fototérmica, además de tener una biocompatibilidad comprobada. Ese nanocompuesto fue probado como agente nanoteragnóstico para evaluar sus propiedades efectivas en imagen y ablación tumoral [100]. También han sido desarrollados Cdots ricos en nitrógeno pirrólico utilizando una síntesis hidrotermal en un solo paso asistida por microondas. Una alta concentración de urea permitió la introducción de una gran cantidad de nitrógeno pirrólico en la superficie de los Cdots. Esas nanopartículas de carga superficial negativa demostraron tener una alta eficiencia fototérmica (54,3%) y fotoluminiscencia en el NIR exhibiendo un pico de absorción a 650 nm. Tienen potencial para ser utilizados como herramientas multifuncionales para imágenes celulares, administración de fármacos y como agentes fototérmicos en el tratamiento del cáncer [101]. Sin embargo, los Cdots desarrollados suelen tener una absorción relativamente baja en la región NIR; lo que restringe una mayor aplicación en biomedicina. El desarrollo de nanoflores de C-dots@Au a través de la deposición de una capa de oro sobre los Cdots podría disminuir esta limitación [90].

Otra herramienta terapéutica importante que ofrecen los Cdots es su capacidad de servir como nanotransportadores para el suministro de medicamentos, por su captación eficiente en los sitios de tumores sólidos. Es importante destacar que los Cdots pueden conjugarse con diversos compuestos para el transporte activo. Han sido reportados varios enfoques sobre el uso de los Cdots fluorescentes verdes como transportadores del fármaco anticancerígeno doxorubicina (DOX), entre ellos mediante el marcaje de la DOX con un colorante fluorescente rojo en las cadenas de PEG sobre la superficie de las nanopartículas o a través de enlaces no covalentes entre sus residuos amínicos y los grupos carboxilo nativos de los Cdots [95, 102]. Ese enlace no covalente sensible a estímulos entre el nanotransportador y la molécula de fármaco es suficientemente estable en sistemas biológicos complejos [102]. Los conjugados mostraron una liberación prolongada de DOX dependiente del tiempo a pH ácido. Es decir, aprovechando la diferencia de pH entre las células cancerosas y normales simulaban la captación lisosómica en las células cancerosas. Además, la liberación pudo controlarse mediante imágenes ópticas utilizando el FRET entre Cdots y DOX [95]. Una de esas estrategias para promover la potencial aplicación clínica de los Cdots en los teragnósticos del cáncer se basa en que los Cdots que emiten en el verde con una superficie rica en carboxilo se han usado como un agente de administración de fármacos rastreable para el tratamiento de cáncer localizado en un modelo de ratón [102]. De forma similar, el oxaliplatino se ha conjugado con Cdots y el sistema híbrido preparado se ha ensayado con éxito como agente teragnóstico *in vivo* [95]. Ha sido reportado también el desarrollo de una formulación de Cdots altamente fluorescentes en un hidrogel a base de quitosan cargado con un fármaco anticancerígeno modelo, el 5-fluorouracilo (5-FU). Los Cdots quedan firmemente enlazados dentro de la matriz del hidrogel a través de interacciones no covalentes durante el proceso de interacción electrostática. Además, estos hidrogeles podían encapsular 5-FU a través de interacciones hidrofóbicas, para formar 5-FU@ Cdots-HY. De esta forma, es posible combinar las ventajas de ambos componentes (Cdots y 5-FU) en una plataforma común para monitorizar la captación celular y los efectos terapéuticos. Los estudios *in vitro* han revelado los aspectos multifuncionales de 5-FU@Cdots-HY en el control de la captación celular y de la sucesiva apoptosis en células A549. La fluorescencia verde de los Cdots en el complejo 5-FU@Cdots-HY ha ayudado en la evaluación cualitativa y cuantitativa de la captación celular. Además de esto, la fluorescencia de los Cdots se puede utilizar para detectar la apoptosis inducida por 5-FU, eliminando la necesidad de colorantes.

La inducción de la apoptosis en células tratadas con 5-FU@Cdots-HY se evidenció por los cambios en las distribuciones del ciclo celular y la visualización de cuerpos apoptóticos característicos mediante microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FE-SEM) [103].

Los Cdots no fueron usados sólo como transportadores para la liberación dirigida de fármacos sino también como vectores no virales de ácidos nucleicos. Por ejemplo, se ha reportado el desarrollo de un nanotransportador de ARN pequeño de interferencia (ARNip) eficiente para la terapia de interferencia en células de cáncer gástrico. Los Cdots fueron sintetizados por microondas en un solo paso con AC como fuente de carbono y triptófano como fuente de nitrógeno y agente de pasivación. Tras adsorción con PEI, las nanopartículas obtenidas (Cdots@PEI) fueron usadas para liberar el ARNip de survivina en la línea celular MGC-803 de cáncer gástrico humano. Los resultados logrados indicaron que esos nanoportadores podrían utilizarse en una amplia gama de sistemas de administración de ARNip para el tratamiento del cáncer [104]. Otro ejemplo: fue reportada una nueva estrategia para sintetizar Cdots fluorescentes con altos QY mediante el uso de RNasa A como plantilla biomolecular bajo irradiación de microondas. Los nanoclusters así preparados (RNasaA@Cdots) se demostraron adecuados para la obtención de imágenes de fluorescencia *in vivo* y el tratamiento simultáneo de tumores en los ratones *nude* que sufren inmunodeficiencia [105].

3. Cdots en la Nanociencia y Nanotecnologías Analíticas

Se comenzó la Introducción de esta Tesis Doctoral comentando la definición de Nanociencia y Nanotecnologías Analíticas, o sea la síntesis de productos y uso de herramientas de tamaño nanométrico en el contexto de la Química Analítica. Entre estos nanomateriales, en los últimos años los Cdots por sus características ganaron importancia dentro de la Nanociencia y Nanotecnologías Analíticas. En el ámbito de la Química Analítica, son muchas las propiedades de los Cdots que se están utilizando para el desarrollo de herramientas útiles para afrontar nuevos retos en el análisis. En concreto, los Cdots están siendo herramientas analíticas sobre todo en los sensores de tipo óptico, en particular de tipo luminiscente.

Aun así, los Cdots no están siendo explotadas sólo por sus propiedades luminiscentes: efectivamente, ha sido reportado en la literatura su empleo también en técnicas separativas, reacciones catalíticas e incluso como analito.

3.1. Cdots como herramienta analítica

Debido a las muchas ventajas de los Cdots, hay un gran interés en la síntesis de nuevos tipos y en ampliar su uso en análisis y detección [37]. La capacidad de ajuste fácil de la fluorescencia de los Cdots ha llevado al desarrollo de una gran cantidad de quimiosensores y biosensores para una serie de analitos [5]. En la actualidad, los sensores de fluorescencia son la herramienta más ampliamente aceptada para la detección de analitos biológicos [106]. Por lo tanto, es normal que los Cdots estén teniendo más aplicaciones con diferencia en este tipo de optosensores, con respecto a su empleo en sensores fosforimétricos y colorimétricos. El tipo de detección más común en el que están involucrados los Cdots es del tipo *turn-off*, o sea que su interacción con el analito produzca una atenuación significativa (*quenching*) de su luminiscencia. Eso ocurre sobre todo por fenómenos de transferencia de carga (tales como FRET), por IFE, o por influencia del pH [54]. En uno de esos casos, un tipo de N,S-Cdots han mostrado una detección altamente selectiva hacia el GSH frente a otros biotioles como Cys y homocisteína (Hcy) [68]. Menos comunes son los sistemas *turn-on*, en los que las interacciones del analito con los Cdots producen un aumento de su luminiscencia. Por ejemplo, fue reportada la síntesis de un aducto Cdots-MnO₂ a partir de una reacción redox en fase acuosa entre KMnO₄ y Cdots moderadamente fluorescentes. En ese aducto ocurrió un fenómeno FRET en el cual se transfirió energía de los Cdots al MnO₂, que dio lugar a que el aducto sólido no fuera fluorescente. El aducto no fluorescente tal como se obtuvo pudo usarse para la detección de N-acetil-1-cisteína (NAC) a través del dicho fenómeno de fluorescencia *turn-on*. El sistema FRET se alteró también en medio ácido, y los Cdots recuperaron su fluorescencia. A partir de esos resultados, el aducto Cdots-MnO₂ se empleó para realizar operaciones lógicas preliminares, es decir, SI e Y usando H⁺ y NAC como entradas. Debido a su rápida respuesta y facilidad de operación, el aducto generado *in situ* podría ser útil para diseñar un dispositivo molecular para la investigación biomédica. También se utilizó ese sistema para diseñar puertas lógicas utilizando KMnO₄ y NAC como entradas [59].

Sin embargo, debido a la falta de selectividad que solían tener esos primeros sistemas de detección, se hicieron estudios para desarrollar sistemas sensores de mayor selectividad [65, 74]. Los más habituales son los sistemas que funcionan como interruptores luminiscentes, llamados *turn-off/turn-on*. En este enfoque, los Cdots primero sufren una atenuación de su luminiscencia por interacciones con un analito, luego la recuperan cuando se introduce un segundo analito que, por mayor afinidad con el primero, permite romper la interacción que éste tenía con los Cdots. Los sistemas *turn-off/turn-on* suelen aprovechar que la luminiscencia de los Cdots es atenuada por iones metálicos, siendo posible su determinación y la de especies que interaccionan con ellos. Por ejemplo, se construyó un quimiosensor fluorescente de doble canal basado en Cdots funcionalizados con Bis (3-piridilmetil) amina (BPMA), llamados BPMA-Cdots, que pudo detectar de forma discriminatoria el GSH de sus análogos Cys y Hcy basándose en dos respuestas fluorescentes distintas de la sonda BPMA-Cdots para Cu^{2+} y Ag^+ , respectivamente. Entonces, se logró la detección selectiva de GSH relacionando la concentración de GSH y la recuperación de fluorescencia del complejo BPMA-Cdots/ Cu^{2+} . La adición de GSH en el sistema BPMA-Cdots/ Cu^{2+} indujo la reducción de Cu^{2+} a Cu^+ , lo que podría bloquear eficazmente el proceso de transferencia fotoinducida de electrones (PET) y producir la siguiente recuperación de fluorescencia. Mientras que la introducción de GSH en el sistema BPMA-Cdots/ Ag^+ desencadenó la coordinación competitiva para Ag^+ entre BPMA y GSH, y finalmente el GSH retiró los iones de plata de la sonda, con lo que la fluorescencia volvió a su estado débil original. Los ensayos del quimiosensor fluorescente de doble canal para la detección selectiva de GSH mostraron buena estabilidad y reproducibilidad, y cubrieron un amplio rango lineal hasta $13,3 \mu\text{M}$ con un límite de detección inferior a 42 nM . Además, fue utilizado para controlar el nivel de GSH en células vivas [94]. Esto es sólo un caso de los muchos reportados en la literatura dónde los biotioles fueron detectados de manera indirecta por los Cdots a través de interacciones con iones metálicos, tales como Hg^{2+} y Cu^{2+} [70]. Estos sistemas de detección han sido empleados para la detección indirecta también de otros analitos, tales como iones sulfuro en presencia de iones Hg^{2+} o Ag^+ , OP o iones cobalto [36, 73, 76]. Además, ha sido reportado el desarrollo de un sensor de fluorescencia basado en el control del grado de pasivación de la superficie de Cdots para la detección de GSH. En comparación con otros métodos analíticos de fluorescencia, ese sensor de fluorescencia no se puede clasificar dentro de los sistemas de tipo *turn-off* o *turn-on*. Es un nuevo método analítico de fluorescencia dónde el analito diana controla indirectamente el grado de pasivación de la superficie de los Cdots para que se pudiera realizar su detección [29].

Mientras, en los sensores de tipo colorimétrico, el cambio de color puede ser producido por una reacción química entre los Cdots y el analito [32]. Los Cdots podrían también actuar como mimético de una enzima cuyo sustrato es el compuesto de interés, o en inmunoensayos [40]. En ambos casos, se trata de un tipo de detección indirecta. Por ejemplo, se ha demostrado que los Cdots tienen una actividad intrínseca tipo peroxidasa. Es decir, en presencia de H_2O_2 los Cdots pueden catalizar la oxidación de los sustratos de la peroxidasa y producir la típica reacción colorimétrica. Esas propiedades catalíticas de los Cdots han permitido la detección colorimétrica de H_2O_2 , glucosa y biotioles en muestras biológicas [26, 91]. Se sabe que los Cdots son a la vez excelentes aceptores y donores de electrones por lo que como agentes oxidantes o reductores dan lugar a reacciones que pueden ser explotadas para detección electroquímica y en catálisis [91]. Los Cdots en combinación con materiales semiconductores han permitido la exploración de numerosas vías alternativas de fotodegradación (PD) [75]. Por ejemplo, se ha demostrado que los Cdots pueden realizar la modulación dinámica del proceso de transferencia de electrones y energía en la interfaz Cdots- TiO_2 mediante un método dependiente del voltaje. También ha sido sintetizado el fotocatalizador Cdots/ $m-BiVO_4$ en el que los Cdots muestran la capacidad de mejorar la actividad fotocatalítica sin tener influencia negativa en las facetas activas del vanadato de bismuto monoclinico ($m-BiVO_4$) [92].

3.1.1. Cdots como sensores ópticos

Tras hacer una revisión general sobre el uso de los Cdots como herramienta analítica, trataremos con más detalles su empleo en sensores ópticos. En primer lugar, veremos algunos ejemplos de sensores del tipo *turn-off*. De particular importancia es la aplicación de Cdots de alta fluorescencia sin ninguna modificación de la superficie para la determinación sensible y selectiva de hemoglobina (Hb) en presencia de H_2O_2 . Aunque la Hb misma pudo atenuar la fluorescencia de los Cdots, basándose en el IFE de la proteína que afecta los espectros de excitación y emisión de los Cdots, la presencia de H_2O_2 dio como resultado una mejora adicional de la sensibilidad de la detección de Hb. El ensayo se basa en la reacción de Hb con H_2O_2 que genera ROS que incluían radicales hidroxilo (OH^\cdot) y superóxido (O_2^\cdot) con la degradación del grupo hemo y/o liberación de hierro de la Hb y la posterior reacción de radicales hidroxilo, como fuertes agentes oxidantes, con los Cdots que dio como resultado un alto *quenching* de la fluorescencia.

La sonda propuesta se usó para la determinación de Hb en el intervalo de concentración de 1-100 nM con un límite de detección de 0,4 nM. El método se ha aplicado con éxito a la determinación de Hb en muestras de sangre humana [65]. Además, se ha descrito la síntesis de N,S-Cdots mediante pirólisis asistida por microondas de AC y N-acetil-L-cisteína. Como su emisión es atenuada de manera eficiente por Cr^{6+} , los N, S-Cdots se emplearon para la detección de Cr^{6+} incluso en imágenes celulares [42]. Más recientemente ha sido reportada la preparación de un sensor en papel basado en Cdots, cuya fluorescencia se atenuó de manera selectiva y eficiente a través de la PET entre los grupos amino primarios y el analito TNT, que pudo ser detectado *in situ* en aguas subterráneas sin ningún otro paso de procesamiento [37]. Entre los sensores del tipo *turn-on*, ha sido reportado un sensor basado en nanopartículas de carbono bifuncionalizadas *in situ* con ácido borónico y grupos amino (B-N-Cdots) para detección fluorescente de la molécula neurotransmisora DA. Ese dispositivo analítico ha demostrado tener una sensibilidad dos órdenes de magnitud más alta que los otros sensores fluorescentes descritos para DA. La fiabilidad analítica de este sensor de DA fue comprobada en muestras de suero humano [69]. Otro método de fluorescencia ultrasensible para la detección de la DA se basa en Cdots dopados con azufre sin ninguna funcionalización de la superficie, que fueron muy eficientes en la detección de la DA en agua, plasma sanguíneo e incluso en células PC12 vivas bajo un ambiente hipóxico; además proporcionaron información sobre la liberación de DA dependiente de Ca^{2+} dentro de las células neuronales [107]. Dentro de los sistemas *turn-off/turn-on* se puede clasificar un sistema sensor para detectar Cys incluso a niveles nanomolares. Primero se investigó la interacción de Cdots preparados a partir de zumo de naranja con AgNPs. Las AgNPs atenúan eficientemente la fluorescencia de los Cdots como resultado de la FRET. Luego, se descubrió que la Cys permite recuperar la fluorescencia de los Cdots debido a la adsorción competitiva de este compuesto sobre los AgNPs [27]. Un sensor de gran relevancia para la detección sensible y selectiva de Hg^{2+} y Cys fue desarrollado basándose en un tipo de Cdots co-dopados con magnesio y nitrógeno (Mg-N-Cdots), que actuaron como un interruptor fluorescente. Se usó AC como fuente de carbono para preparar los Cdots. Se eligió $\text{Mg}(\text{OH})_2$ como agente para proteger los grupos carboxilo del AC por quelación durante el procedimiento de deshidratación y carbonización. La EDA como reactivo de pasivación de superficie fue capaz de proporcionar átomos de nitrógeno. Teniendo en cuenta que la EDA es volátil, su dosis se redujo a 0,5 μL en ese sistema, una cantidad mucho menor que en trabajos reportados. Los Mg-N-Cdots sintetizados por el método hidrotermal poseían una alta intensidad de fluorescencia.

Sin embargo, después de la adición de Hg^{2+} , la fluorescencia de la solución acuosa de Mg-N-Cdots se atenuó drásticamente, lo que pudo atribuirse a la formación de un complejo no fluorescente entre Mg-N-Cdots y Hg^{2+} . La fluorescencia de la disolución acuosa de Mg-N-Cdots que contenía Hg^{2+} pudo recuperarse gradualmente en presencia de Cys, debido a la afinidad de unión más fuerte de Hg^{2+} hacia Cys que hacia Mg-N-Cdots. La sonda fluorescente fue usada para detectar Hg^{2+} en muestras reales de agua con resultados satisfactorios. Además, una compuerta lógica del tipo IMPLY fue construida usando Hg^{2+} /Cys como entradas y la señal de fluorescencia de Mg-N-Cdots como salida [52]. Se describen a continuación dos ejemplos de sensores ratiométricos de fluorescencia basados en Cdots. En el primero se preparó un sensor de fluorescencia de tipo ratiométrico de impresión molecular basado en nanopartículas de doble emisión (D-NPs) a 460 nm y 580 nm que usaba Cdots y AuNCs para la detección de bisfenol A (BPA). La viabilidad del método desarrollado se evaluó con éxito mediante el análisis de BPA en muestras reales (agua y alimentos enlatados) [30]. Por otra parte, tenemos un sensor fluorescente ratiométrico basado en Cdots en el que el dispositivo analítico (Cdots-FITC) fue fabricado conjugando una fluoresceína sensible a pH, el isotiocianato de fluoresceína (FITC), en la superficie de los Cdots. Ese sensor de pH tuvo una característica típica de las sondas ratiométricas: que la relación de dos intensidades de emisión era independiente de su concentración. Fue usado, por ejemplo, para medir ácidos muy débiles, tales como ácido bórico e hidrocloreuro de hidroxilamina, en muestras de agua de grifo y agua de lago [86]. Entre las aplicaciones de Cdots en sensores ópticos de fotoluminiscencia, hay que mencionar el uso como sonda para determinar el contenido en agua en disolventes orgánicos de N,S-Cdots con una fuerte emisión de luz azul encapsulados en redes metal-orgánicas (MOFs) de europio (Eu-MOF) emisoras de luz roja que forman un nanohíbrido emisor de luz de dos colores (Eu-MOFs/N,S-Cdots) [108]. También fue reportada la síntesis de Cdots modificados con restos amino con la capacidad de interactuar con el ADN y cuyo uso se propone para la detección de daños en el ADN. Ese sensor ha sido probado en el análisis del ADN genómico de células PC-3 y ADN aislado de tejidos de melanoma [46]. Los Cdots han sido ampliamente usados en imagen celular, en particular para señalar la presencia de iones metálicos en células eucariotas y procariotas [72]. Se ha publicado una estrategia de síntesis en fase sólida en un solo paso de Cdots fluorescentes modificados con colistina (Cdots@colistina) para la detección selectiva de bacterias Gram negativas como *E. coli*. También se han empleado esos Cdots para la determinación selectiva de Fe^{3+} en orina humana, jugo de manzana y agua del grifo [87].

Otro ejemplo es un nuevo tipo de Cdots (Cdots-Fla) para la detección de Pb^{2+} , que fue sintetizado a través de una ruta hidrotermal en un solo paso utilizando extractos de flavonoides de hojas de *Ginkgo biloba* como material de partida. Estos Cdots-Fla han demostrado ser una buena sonda para imagen de fluorescencia de Pb^{2+} intracelular. Las capacidades de estos Cdots-Fla se mejoraron al incorporarlos en hidrogel de agarosa (Cdots-AHG). Ese conjugado permitió tanto la determinación como la eliminación de Pb^{2+} del agua [74]. Un uso combinado de medidas fluorimétricas y colorimétricas ha sido propuesto en una bioplataforma sin etiquetas para la detección sensible de OP a través de esos dos canales basados en el *quenching* controlado por acetilcolinesterasa (AChE) de Cdots fluorescentes. Ese sensor presenta una buena sensibilidad para la detección rápida de paraoxón, como analito modelo, con un límite de detección de $0,4 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ [36]. Hay que mencionar también un sensor colorimétrico para determinar selectivamente y fácilmente Cd^{2+} . Su mecanismo de detección es de tipo operacional, basado en la dependencia del color de la agregación de nanopartículas. Se han preparado con éxito nanopartículas de oro recubiertas con Cdots dopados con nitruro de grafito (Au@g-CN Cdots), con numerosos grupos heptazina, carboxilo e hidroxilo en la superficie. Eso refuerza la adsorción de los iones Cd^{2+} a través de un “efecto cooperativo”. Como consecuencia, los iones Cd^{2+} pueden ser detectados incluso a simple vista. Esta capacidad de detección visual proporciona un método robusto para detectar iones Cd^{2+} *in vivo* en tejidos de órganos de ratones [32]. Hasta aquí se han recogido los principales tipos de sensores ópticos basados en Cdots reportados en la literatura. Aun así, los Cdots se han utilizado en muchos otros tipos de sensores, incluso de fluorescencia en los que se antoja complicado clasificar la interacción entre los Cdots y el analito dentro de las categorías principales antes comentadas. Por ejemplo, se ha desarrollado un sistema conjugado (PCdots - Au^{3+}) basado en Cdots sobre papel (PCdots) como un sensor de fluorescencia que puede distinguir entre el azufre orgánico e inorgánico presentes en analitos en base al cambio en las propiedades de fotoluminiscencia. Este sistema mostró un aumento de la fotoluminiscencia para azufre orgánico y disminución de fotoluminiscencia en analitos inorgánicos conteniendo azufre. El sensor fue usado con éxito en el análisis de muestras reales como leche [5]. Un ejemplo de sensor basado en TPF es el conjugado de Cdots de doble emisión (Cdots 1/Cdots 2) fabricado a partir de la combinación de los Cdots 1 funcionalizados con PEI con los Cdots 2 modificados con carboxilo. El conjugado Cdots 1/Cdots 2 fue desarrollado como un nuevo sensor de conmutación dual de TPF para la detección reversible y simultánea de Cu^{2+} y Hg^{2+} sobre otros iones metálicos y moléculas biológicas en muestras reales de agua y fluidos biológicos con altas recuperaciones [53].

Mediante la evaluación de la intensidad de emisión de fluorescencia de Cdots sintetizados a partir de clorofila, se ha desarrollado una plataforma basada en FRET para la determinación de OP, tales como el paraoxón. Aunque el mecanismo es complejo y constaba de varios pasos, la aplicación a muestras de agua de grifo y de río reveló que esta plataforma es precisa y da resultados reproducibles [73]. También se ha reportado un nuevo sensor fluorescente selectivo para UO_2^{2+} , Sm^{3+} y Eu^{3+} basado en un híbrido Cdots-aerogel preparado mediante carbonización *in situ* de 2-tenoiltrifluoroacetona (TTA), un quelante de alta afinidad para metales pesados [56]. Fueron también sintetizadas nanopartículas de carbono codopadas con fósforo y nitrógeno (P,N-Cdots) como sensor de fluorescencia altamente selectivo para la detección de iones Co^{2+} en agua de río mediante un protocolo hidrotérmico de un solo paso empleando piridoxal-5-fosfato y etanodiamina [76]. De aplicación reciente es también el aptasensor de fluorescencia para la determinación sensible de bisfenol S (BPS) mediante FRET entre el emisor 0D (Cdots) y el absorbente 2D (nanoplaquetas de MoS_2) gracias a la discriminación específica y efecto protector del aptámero anti-BPS en el MoS_2 estratificado [77]. Una de las últimas fronteras en el uso de Cdots en sensores ópticos es su combinación con polímero(s) de impresión molecular (MIPs). Como ejemplo, ha sido reportado un sensor óptico basado en Cdots recubiertos con un MIP para la determinación selectiva y sensible de clorhidrato de prometazina (PrHy) que mostró resultados satisfactorios en muestras reales [58].

3.1.2. Cdots en reacciones catalíticas

Debido a la abundancia de grupos funcionales en la superficie, los Cdots podrían combinarse fácilmente con otros compuestos y mejorar sus propiedades catalíticas, o incluso actuar como catalizadores principales, gracias por ejemplo a sus propiedades miméticas de la actividad enzimática. Ha sido reportado un sensor colorimétrico para GSH donde los Cdots se han usado como catalizadores miméticos de peroxidasa. Los radicales catiónicos libres de color azul se generaron simplemente mediante una reacción de oxidación de la 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) por H_2O_2 catalizada por los Cdots. Como aplicación práctica, este quimiosensor se usó para medir el contenido de GSH en sangre humana total [26]. Los Cdots se consideran nanomateriales prometedores también para el diseño de fotocatalizadores.

Con la contribución de la gran cantidad de restos funcionales en su superficie, tales como grupos -OH, C=O, -COOH, los Cdots en combinación con otros materiales semiconductores como C_3N_4 , TiO_2 , NiP y $BiVO_4$ pueden mejorar la absorción de la luz, así como la recolección de la respuesta de la luz visible para mejorar las propiedades fotocatalíticas [75]. En estos sistemas, los Cdots también juegan un papel importante en el aumento de la eficiencia de separación fotoinducida de los pares electrón - hueco con una excelente velocidad de transferencia de carga [109]. Por ejemplo, se ha publicado la fabricación de un sistema π -conjugado Cdots/ MoS_2 como catalizador de tipo HER. Después de la irradiación con luz visible durante 30 minutos, el compuesto Cdots/ MoS_2 (como Cdots/ MoS_2 -L30) realizó una mejor actividad HER, caracterizada por un pequeño sobrepotencial de $\sim 0,125$ V a 10 mA cm^{-2} , una alta densidad de corriente, una pequeña pendiente de Tafel de 45 mV/década y estabilidad a largo plazo en H_2SO_4 0,5 M. Este tipo de mejora de la actividad hacia la HER puede deberse a la alta eficiencia de transferencia de carga, la disminución de S^{4+} y el aumento de S_2^{2-} y S^{2-} después del tratamiento con luz [92]. Además, se sintetizó con éxito el complejo N-Cdots/ g-CNQdots impulsado por luz visible mediante la carga de los N-Cdots en las capas intermedias y sobre la superficie de g-CNQdots *vía* polimerización. La actividad fotocatalítica de este compuesto fue significativamente más alta que la de sus componentes individuales hacia la degradación de la indometacina (IDM) bajo irradiación con luz visible [60]. Recientemente, se ha preparado un nanocompuesto de Cdots y hematita (Cdots- Fe_2O_3) como fotocatalizador para la descomposición del agua impulsada totalmente por luz visible sin necesidad de agente secuestrador y/o polarización externa [109]. Otro enfoque novedoso se ha adoptado para preparar un compuesto de Cdots y dióxido de titanio (P25/Cdots) que mostró una mejor mineralización fotocatalítica hacia la RhB con respecto al semiconductor comercial P25 a base de TiO_2 [75].

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

Durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral se han necesitado diversos materiales, instrumentos y se han aplicado diversas metodologías analíticas. Para su descripción se han dividido en cinco categorías principales:

1. Productos químicos.
2. Materiales.
3. Instrumentación y software.
4. Metodologías.
5. Rendimiento cuántico de fluorescencia de los Cdots.

En este Capítulo II se presenta la información metodológica.

1. Productos químicos

Todos los productos químicos utilizados en el desarrollo de esta Tesis Doctoral fueron de calidad analítica y se utilizaron sin ulterior purificación. Entre ellos tenemos: ácido cítrico anhidro, fosfato disódico, hidróxido sódico, ácido clorhídrico del 37%, ácido nítrico del 69%, cloruro sódico, tricloruro de hierro anhidro y cloruro estannoso dihidrato, reactivos adquiridos en Panreac Química SLU (Barcelona, España). El hidróxido de magnesio, etilendiamina, dihidrógenofosfato de sodio, Trizma base, DL-cisteína, L-glutación, hemoglobina en polvo, peróxido de hidrógeno al 30% (v/v) y tartrato antimonil potasio fueron adquiridos de Sigma-Aldrich Química S.A. (Madrid, España). Por otra parte, han sido usadas disoluciones patrón $1,000 \pm 0,002 \text{ g L}^{-1}$ IC de nitrato de aluminio nonahidrato, nitrato de bario, nitrato de cadmio tetrahidrato, nitrato de cobalto hexahidratado, nitrato de cromo nonahidrato, nitrato mercuríco en agua, nitrato de plomo en agua, nitrato de cinc hexahidrato en ácido nítrico 0,5 M; también ha sido utilizada una disolución patrón de ácido selenioso en ácido nítrico 1 M. Todos estos reactivos fueron suministrados por Panreac Química SLU (Barcelona, España). Las disoluciones patrón 1000 mg L^{-1} de nitrato de calcio y nitrato cúprico en ácido nítrico 0,5 M fueron adquiridas en Merck (Darmstadt, Alemania).

El tampón fosfato (dihidrogenofosfato de sodio/ fosfato disódico 0,02 M, pH 1,5-12,5) se preparó por disolución de los reactivos necesarios en agua y el pH se ajustó mediante la adición de ácido clorhídrico y/o hidróxido sódico. El tampón Tris-ácido clorhídrico 10 mM pH 7,5 se preparó mediante la disolución en agua del Trizma base necesario y el pH se ajustó mediante la adición de ácido clorhídrico 0,1 M. La disolución de cloruro sódico 3 M se preparó disolviendo el peso necesario del reactivo comercial en agua. Normalmente, las soluciones de trabajo de los analitos y los interferentes se prepararon todos los días por dilución en agua de los respectivos patrones comerciales. La concentración final de las disoluciones de trabajo de los metales fue 10 mM para Ca^{2+} , Co^{2+} , Cr^{3+} , Cu^{2+} , K^+ , Na^+ y Se^{4+} ; de 4,8 mM para Pb^{2+} y de 8,9 mM para Cd^{2+} . Por otra parte, la concentración final de las disoluciones de trabajo de Ba^{2+} y Hg^{2+} correspondieron con las de su estándar (7,3 y 5,0 mM, respectivamente). La disolución de Fe^{3+} 10 mM fue preparada disolviendo en ácido nítrico el cloruro férrico anhidro en polvo. Las disoluciones de antimonio (III) y estaño (II) 10 mM fueron preparadas a partir de reactivos sólidos comerciales (tartrato antimonil potasio y cloruro estañoso, respectivamente). En este caso el medio ácido de las disoluciones patrón interfirió en las medidas porque el exceso de acidez presente produjo una atenuación de la fluorescencia de las nanopartículas originando un artefacto. El tartrato antimonil potasio fue disuelto en agua, mientras el cloruro estañoso fue disuelto en ácido clorhídrico 5 M. Hay que destacar que fue añadido hidróxido sódico 1 M a las muestras antes de la adición de Sn^{2+} 10 mM, una concentración suficiente a neutralizar el medio y evitar la atenuación de la intensidad de la fluorescencia originando un falso positivo.

2. Materiales

Para la purificación de los Cdots han sido usadas las membranas de diálisis de 1 y 3,5 kD Spectra/ Por[®] (Spectrum Laboratories Inc., CA, EE.UU.), y también los filtros de nylon 0.2 μ 17 mm pK 100 F2613-2 (Symta S.L.L., Madrid, España).

3. Instrumentación y software

Todas las soluciones acuosas se prepararon en agua purificada (resistencia 18,2 M Ω ·cm) obtenida de una estación Milli-RO 12 plus Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EE.UU.). Las medidas de fosforescencia y de fluorescencia se realizaron en el espectrómetro de luminiscencia Cary Eclipse Varian (Agilent Technologies, Santa Clara, EE.UU.) equipado con una lámpara flash de xenón pulsante a 80 Hz y con una anchura de pulso de 2 μ s. El espectrómetro estuvo controlado por un ordenador con un procesador Intel Pentium 4 con 250 Mb de memoria RAM y sistema operativo Windows 2000; además estuvo equipado con el software Cary Eclipse Win-FLR. Las medidas de absorción fueron realizadas utilizando un espectrofotómetro de matriz de diodos Agilent 8453 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU.), controlado por un ordenador Pentium MMX 200 provisto de un disco duro (HDD) de 4,3 Gb, CD-ROM 40x, 64 Mb de RAM y sistema operativo Windows 95, mediante una interface InfiniBand (IB) HP y cables con grado de protección (IP) HP. Los espectros UV-Vis se recolectaron en el rango de 250-800 nm mediante el software UV-Visible ChemStation Software Rev. A.08.03 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU.). Los datos experimentales fueron almacenados tras las medidas y a continuación tratados mediante el software correspondiente y Microsoft Excel. En los experimentos descritos en la presente Tesis Doctoral han sido usados también otros instrumentos y aparatos de laboratorio: pHmetro Crison micropH 2000 (Hach Lange España, Barcelona) para medir el pH; horno Venticell VC55 (MMM Group, Munich, Alemania) y microondas Start Milestone (Gomensoro S.A. Instrumentación Científica, Madrid, España) en la síntesis de los Cdots; centrífuga Digicen 20 (Ortoalresa, Madrid, España) y liofilizador LyoQuest (Azbil Telstar Technologies SLU, Terrassa, España) para la purificación de los Cdots. También ha sido usado un baño de ultrasonidos con calefacción Ultrasons HD 5 litros (JP Selecta S.A., Barcelona, España) para disolver algunos reactivos con más eficacia. La estufa ULM500 (Memmert, Schwabach, Alemania) ha sido empleada para evaporar las suspensiones de Cdots y así poder calcular su peso seco.

4. Metodologías

4.1. Espectrofluorimetría

Por el principio de exclusión de Pauli, en un átomo no puede haber dos electrones con los cuatro números cuánticos iguales, es decir que los dos electrones de un orbital dado deben tener espines en direcciones opuestas, por lo tanto, el espín total (S) debe ser igual a cero. Debido a esto, el estado fundamental no tiene un espín electrónico neto y tal estado es denominado estado singlete. Mientras, cada estado molecular electrónico tiene varios estados vibracionales asociados. En el estado electrónico fundamental casi todas las moléculas se encuentran en su estado vibracional más bajo a temperatura ambiente. Al excitar con una radiación de la zona del UV o el visible, se provoca que la molécula sea excitada a un estado vibracional superior de un estado electrónico excitado. La pérdida del exceso de energía vibracional y electrónica en la molécula ocurre inmediatamente, y ésta es absorbida por otras moléculas (experimentalmente moléculas del disolvente que se encuentran en constantes colisiones elásticas con la molécula excitada). La desactivación no radiante del estado excitado de la molécula se llama relajación vibracional (RV) cuando ésta pierde la energía vibracional dentro de un cierto estado electrónico dado y conversión interna (CI) cuando sufre una transición de un estado electrónico superior a uno más bajo con la misma multiplicidad de espín sin emitir radiación. RV y CI llevan a la molécula al nivel vibracional más bajo de su estado singlete excitado más bajo en un periodo de 10^{-14} a 10^{-12} s. Se trata del fenómeno conocido como absorción, que trataré más adelante. Muchas moléculas regresan de nuevo al estado fundamental electrónico por desactivación térmica; sin embargo, en algunas moléculas, concretamente aquellas con estructura rígida, el retorno desde el estado excitado singlete más bajo del estado electrónico ocurre por mecanismos más lentos que la RV y la CI. Uno de éstos implica emisión directa de radiación visible o UV, cuyas frecuencias y longitudes de onda vienen dadas por la diferencia de energía entre el estado singlete excitado más bajo y el estado electrónico fundamental. La transición radiativa entre estos estados ocurre entre 10^{-11} y 10^{-7} s después de la excitación inicial y se llama fluorescencia.

El hecho de que el estado fundamental electrónico de la molécula tenga varios niveles vibracionales causa que su fluorescencia no ocurra a una sola longitud de onda, lo cual difiere por lo sugerido en la ecuación de Planck. De hecho, la fluorescencia se manifiesta sobre un amplio rango de longitudes de onda los cuales corresponden a varias transiciones vibracionales que son componentes de una única transición electrónica. Desde el estado triplete excitado más bajo, las moléculas pueden pasar al estado electrónico fundamental (S_0) con o sin emisión de radiación. Esta emisión radiativa involucrada en la transición al estado fundamental electrónico más bajo se llama fosforescencia. Esta transición está prohibida por la ley de conservación del momento angular y se caracteriza por su larga duración (10^{-6} – 10 s). Algunas moléculas o bien fluorescen o bien fosforescen, lo cual las hace complementarias, en vez de competitivas, desde un punto de vista analítico. Sin embargo, algunas especies moleculares tienen la capacidad de fluorescer y fosforescer al mismo tiempo. En este caso, según lo que establece la regla de Hund, la energía asociada con un estado de espines paralelos es siempre más baja que uno con los espines antiparalelos. Debido a que el estado triplete siempre se encuentra en un estado de menor energía que el estado singlete más bajo, la fosforescencia ocurre a longitudes de onda mayores que la fluorescencia. Las medidas de fluorescencia y fosforescencia fueron realizadas mediante dos modos diferentes: barrido y cinética. En el primero, usado para determinar el comportamiento luminiscente de las nanopartículas, la longitud de onda de excitación fue ajustada a 340 nm, midiendo la emisión en el rango 360-650 nm. Esos parámetros fueron establecidos para los experimentos descritos en el Capítulo III de la presente Tesis Doctoral. Mientras, en los experimentos descritos en el Capítulo IV de esta Tesis Doctoral los espectros de emisión se midieron en un rango de longitud de onda de 350 a 650 nm. Por otra parte, en los ensayos descritos en el Capítulo V las muestras fueron excitadas a 390 nm y los espectros de emisión se midieron en un rango de longitud de onda de 400 a 700 nm. Las rendijas de entrada y salida fueron ajustadas a 20 nm, el tiempo promedio a 0,1 segundos, el intervalo de datos a 1,000 nm y el voltaje a 1000 V. La posibilidad de trabajar con rendijas más anchas fue empleada principalmente porque los efectos debidos a la luz dispersada no se dieron apenas en fosforimetría. El modo cinético de las medidas fue usado concretamente en las muestras experimentales, permitiendo múltiples medidas de las que luego se empleó un valor promedio.

Con respecto al modo barrido, las longitudes de excitación y de emisión se establecieron en 360 y 442 nm, respectivamente; el tiempo promedio a 0,05 segundos; en algunos casos, para los experimentos de optimización del tiempo, fueron ajustados el tiempo de duración del ciclo y la detención del tiempo de medida a 1 y 50 minutos, respectivamente. Para las medidas de fosforescencia el tiempo de retraso fue ajustado a 0,150 ms. Todas las mediciones se realizaron en una celda de cuarzo de trayectoria óptica de 10 mm. Los datos experimentales fueron guardados al momento de las medidas y tratados mediante el software correspondiente y Microsoft Excel.

4.2. Espectrofotometría UV-Vis

La absorción es el resultado de la interacción del campo eléctrico asociado a la luz con los electrones menos energéticos de la molécula en cuestión, en este caso, la molécula absorbente.

La interacción del campo eléctrico altera la distribución electrónica de dicha molécula y provoca que la energía sea cedida por el campo eléctrico de la onda y se utilice en la promoción energética de dichos electrones. Esta absorción de energía se produce en un tiempo del orden de 10^{-15} s. La intensidad de luz absorbida (I_a) viene dada por la ley de Lambert-Beer:

$$I_a = I_0 - I_t = I_0 \cdot (1 - 10^{\epsilon b C})$$

Donde I_0 e I_t son las intensidades de luz incidente y transmitida, respectivamente. Por su parte ϵ es la absorptividad molar, la cual representa la probabilidad de absorción para cada especie molecular, C es la concentración de la sustancia absorbente (mol L^{-1}) y b es el espesor en centímetros del recipiente de la muestra. La energía de la luz viene dada por la ecuación de Planck:

$$E = N h \nu = N h c / \lambda$$

Donde E es la energía asociada a la frecuencia (ν) y longitud de onda (λ), c es la velocidad de la luz y N es el número de Avogadro.

El hecho de que los niveles de energía moleculares estén cuantizados prevé que una especie molecular dada absorberá luz sólo si E coincide con la diferencia de energía entre el estado electrónico fundamental y el estado electrónico en la molécula excitada.

5. Rendimiento cuántico de fluorescencia de los Cdots

El rendimiento cuántico de fluorescencia (QY) de los Cdots se determinó mediante el método de la pendiente descrito en la literatura [110, 111]. El sulfato de quinina en una disolución acuosa de H_2SO_4 al 95 %, cuyo rendimiento cuántico reportado en la literatura es de 0,54 ha sido elegido como estándar para medir el QY de los Cdots.

Para estos experimentos, se prepararon una disolución de sulfato de quinina 0,4 nM y varias disoluciones de Cdots, de manera que todas ellas tenían una absorbancia menor de 0,05 a las longitudes de onda de 290 nm (Capítulo V) o 348 nm (Capítulo IV).

Las gráficas se trazaron utilizando la intensidad de la fluorescencia integrada frente al valor de la absorbancia. Para calcular el rendimiento cuántico se utilizó la siguiente ecuación:

$$\Phi_X = \Phi_R \cdot \frac{m_X}{m_R} \left(\frac{\eta_X}{\eta_R} \right)^2$$

Siendo Φ el rendimiento cuántico, m la pendiente y η el índice de refracción. Se establecieron los subíndices “R” y “X” para referirse al estándar y a las muestras, respectivamente. Para estas soluciones acuosas, $\eta_X/\eta_R = 1$.

CAPÍTULO III

Capítulo III

**DETERMINACIÓN
FOSFORIMÉTRICA DE BIOTIOLES
BASADA EN CARBON DOTS**

Capítulo III

1. Introducción

1.1. ¿Qué son los Cdots? Propiedades y ventajas sobre otros nanomateriales

Las nanopartículas o puntos cuánticos de carbono (Cdots) recibieron ese nombre en 2006 [27, 52]. Estos Cdots han llamado la atención en los últimos años en la Química Analítica y en Bioanalítica debido a sus propiedades ópticas únicas y a sus propiedades fisicoquímicas y fotoquímicas. Por ejemplo, los Cdots muestran una fotoluminiscencia dependiente del tamaño y propiedades de luminiscencia de *up conversion* debido a un proceso multifotónico, que conduce a la emisión de tipo anti Stokes. En comparación con los que tienen sólo *down conversion*, los materiales *up conversion* tienen muchas ventajas para futuras aplicaciones biológicas, como la mayor profundidad de penetración bajo irradiación de tipo NIR y la ausencia de autofluorescencia en los tejidos biológicos [84]. Se conoce comúnmente que los efectos cuánticos, el estado de la superficie y los núcleos carbogénicos son los factores principales que afectan a la emisión de los Cdots [68]. La dependencia de la temperatura podría atribuirse al estado de los canales no radiativos en la superficie. Se activarán más canales no radiativos a una temperatura más alta, y más electrones excitados regresarán al estado fundamental a través de un proceso no radiativo, lo que resultará en una disminución de la intensidad de fluorescencia. Esta característica sensible a la temperatura ha hecho de los Cdots buenos candidatos para el diseño de dispositivos de monitorización de temperatura [68]. Por otra parte, los Cdots se pueden usar en aplicaciones biológicas o ambientales [84]. En particular, a la vista del cambio de la intensidad de la fluorescencia que muestran en el proceso de detección, los Cdots están siendo utilizados como sondas fluorescentes para detectar cationes metálicos (Hg^{2+} , Fe^{3+} , Ag^+ , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Sn^{2+}) y biomoléculas, tales como L-cisteína (L-Cys), homocisteína (Hcy) y glutathione (GSH). Los Cdots ofrecen potenciales ventajas tales como originar procedimientos de detección de alta sensibilidad, económicos y convenientes [80]. Si bien estos materiales basados en Cdots son muy prometedores en nanotecnología y nanomedicina, todavía se necesita mucho trabajo para explorar todo el potencial de estos nanomateriales en el desarrollo de sensores inteligentes avanzados [6, 84].

En comparación con los Quantum dots (Qdots) basados en metales pesados y con los colorantes fluorescentes orgánicos, los Cdots han generado enormes expectativas en biosensores ópticos y en bioimagen debido a que sus propiedades fotofísicas se les asemejan en muchos aspectos pero resultan superiores en otras cualidades tales como alta estabilidad química, la ausencia de *blinking* (parpadeo), bajo riesgo ambiental, baja toxicidad (debido a la ausencia de iones metálicos tóxicos) incluso a nivel celular, bajo costo, alta y excelente fotoestabilidad, alto rendimiento cuántico, resistencia al fotoblanqueo, emisión de luminiscencia altamente estable que es sintonizable porque depende de la longitud de onda de excitación, simplicidad de síntesis y facilidad de funcionalización de la superficie, sin incurrir en la escasez elemental y sin la necesidad de etapas de preparación estrictas, intrincadas, tediosas, costosas y/o ineficientes [26-29, 48, 52, 68, 70, 91]. Mientras tanto, en comparación con otros nanomateriales de carbono fluorescentes como el grafeno y los puntos cuánticos de nitruro de carbono grafitico (g-CNQD), los Cdots tienen aún más ventajas, debido a la existencia de grupos carboxilo y amino en su superficie [28, 29]. Además, se sabe que los Cdots son excelentes aceptores y donores de electrones, o sea que tienen un potencial prometedor como agentes oxidantes o reductores [91]. Estas características únicas han originado un gran interés en el uso de Cdots en bioensayos y biosensores, sondas fluorescentes, bioimagen, detección química y fotocatalisis [29, 52, 70]. Entre las estrategias de síntesis de los Cdots, el enfoque hidrotermal demostró ser fácil y eficaz para producir Cdots fluorescentes, siendo un método simple, rentable, a gran escala y respetuoso con el medio ambiente [68, 91]. Para mejorar aún más las propiedades luminiscentes y ampliar el rango de aplicación de los Cdots, estos han sido modificados normalmente mediante funcionalización de la superficie y el dopado con heteroátomos, especialmente nitrógeno, azufre o elementos metálicos. Por ejemplo, el dopado con nitrógeno puede llevar consigo un aumento sustancial de la luminiscencia y mejorar el rendimiento cuántico de los Cdots funcionalizados [52].

1.2. ¿Qué son los biotioles? Características, interés de su detección, tipos de detección.

Los biotioles (Figura 1) son biomarcadores que juegan un papel importante en una gran cantidad de procesos biológicos.

Por lo tanto, es de gran interés el desarrollo de métodos sensibles, selectivos y rápidos para su determinación en muestras biológicas [43]. Los biotioles más importantes son la L-cisteína (L-Cys), homocisteína (Hcy) y glutatión (GSH). La L-cisteína es el único aminoácido que contiene azufre (en forma de tiol) de los veinte aminoácidos necesarios para la biosíntesis de proteínas [27, 49, 52]. También es un precursor necesario para la biosíntesis de GSH. Los enlaces disulfuro, que pueden formarse entre dos residuos de L-Cys tras la oxidación de sendos grupos tioles, desempeñan funciones estructurales esenciales en muchas proteínas [27]. La L-Cys está involucrada en muchos procesos fisiológicos importantes, tales como el mantenimiento de la homeostasis redox biológica, la desintoxicación y el metabolismo [41, 52, 80]. También es conocida como componente principal de los aminotioles presentes en el suero humano [70]. La Hcy es un aminoácido que difiere de la cisteína en un puente metileno adicional ($-\text{CH}_2-$). La concentración intracelular de Hcy en condiciones normales se mantiene baja. Los biotioles resultan ser componentes de muchas proteínas y moléculas en los sistemas biológicos y desempeñan un papel fundamental en el sistema de defensa antioxidante celular por su participación en reacciones redox reversibles. El glutatión en su forma reducida es un importante tripéptido (γ -glutamil-L-cisteinilglicina) que se produce de forma endógena a partir de glicina, L-Cys y ácido L-glutámico (L-Glu) [28, 29, 41]. Tiene una amplia utilidad en plantas, mamíferos, hongos y algunos organismos procarióticos [26]. Es la molécula intracelular de tipo tiol no proteico más abundante, desempeña funciones clave en muchos procesos fisiológicos, por ejemplo, en la regulación génica y del crecimiento celular, la transducción intracelular de señales, la función de las proteínas y el metabolismo xenobiótico [28, 29, 41, 68]. El GSH ayuda a mantener las funciones normales del sistema inmunológico. Por cierto, las personas infectadas con el VIH tienen una disminución de GSH en plasma que puede potenciar la replicación del VIH y acelerar la progresión de la enfermedad. Desde luego, la deficiencia de GSH contribuye a la depresión general de las funciones inmunitarias [91]. Es preciso destacar que el GSH es un antioxidante endógeno esencial en la defensa de los componentes celulares contra ROS, radicales libres y peróxidos electrófilos y en el mantenimiento de las actividades redox intracelulares [28, 41]. Si las células están bajo estrés oxidativo, se romperá el equilibrio entre el GSH y su forma oxidada, el disulfuro de glutatión (GSSG). Bajo el efecto de la GSH reductasa, el GSSG se transforma rápidamente en GSH para aliviar el estrés oxidativo de las células [94].

Todo ello sin olvidar que el GSH es un sustrato o cofactor para varias enzimas protectoras, como la peroxidasa [26, 29, 68]. Además, debido a sus importantes propiedades antioxidantes, el GSH se está usando ampliamente en alimentos saludables, industria de cosméticos y productos farmacéuticos [29].

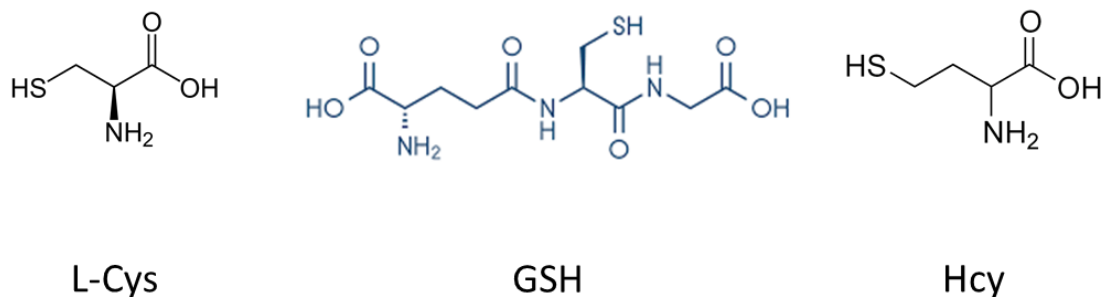


Figura 1. Biotioles más importantes.

La alteración de la concentración de biotioles en el cuerpo humano se ha relacionado con varias enfermedades [91]. Específicamente, la deficiencia de Cys da como resultado una serie de trastornos, tales como edema cerebral, lesiones cutáneas, daño hepático, enfermedades cardiovasculares, retraso del crecimiento, enfermedad de Alzheimer; también causa debilidad, letargo y adelgazamiento, así como despigmentación del cabello [27, 41, 52, 80, 91], mientras que los niveles elevados de Cys se asocian con la neurotoxicidad [27, 49, 52]. Los niveles elevados de Hcy en plasma están asociados con el desarrollo de demencia en la enfermedad de Alzheimer. También parecen predecir de una manera particularmente fiable las enfermedades cardiovasculares y la osteoporosis [49, 91]. Además, enfermedades de enorme importancia clínica están correlacionadas con el estado redox intracelular (relación GSSG/GSH). Por ejemplo, un nivel anormalmente bajo de GSH se puede asociar con una amplia gama de patologías que incluye el cáncer, las enfermedades cardiovasculares (ECV), el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), enfermedades neurodegenerativas (tales como la de Parkinson y la de Alzheimer), el autismo y el retraso del crecimiento de los niños, el envejecimiento, la dermatosis, la insuficiencia hepática, algunas enfermedades de la sangre, diabetes mellitus y otras [26, 28, 29, 94].

Hasta la fecha, existe un creciente interés en detectar el GSH en muestras de sangre para diagnosticar con precisión algunas enfermedades en una etapa temprana. Por lo tanto, es necesario explorar un método eficiente para la detección sensible y selectiva de GSH en muestras de sangre humana [16]. Simultáneamente, el GSH es un componente natural de nuestra dieta y desempeña importantes funciones fisiológicas *in vivo*, como nucleófilo eliminador de radicales libres. Se confirmó que las frutas frescas, verduras y carnes recién cocidas contienen un alto contenido de GSH. Por otra parte, el GSH también está presente en los vinos, dónde puede actuar como antioxidante, atrapando las quinonas y evitando la pérdida del aroma afrutado [41]. Debido a sus importantes funciones, se han realizado grandes esfuerzos para desarrollar métodos eficientes de monitorización y control del contenido de GSH en muestras no sólo biológicas, sino también de alimentos y vino. Se han desarrollado varios métodos de detección de biotioles a lo largo de los años, tales como métodos electroquímicos, colorimétricos, fluorescentes, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), dispersión Raman aumentada en superficie (SERS) y espectrometría de masas. Fueron desarrolladas también varias técnicas novedosas de detección de biotioles basadas en pequeñas sondas moleculares diseñadas racionalmente, como la de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) mediada por balizas moleculares, o materiales avanzados como nanopartículas de *up conversión* (UCNPs), QDs, nanoclusters, nanopartículas de oro (AuNPs), *etc.* Sin embargo, algunos de estos métodos presentan una baja sensibilidad de detección, emplean instrumentación compleja, procedimientos de ensayo complicados, materiales costosos o tóxicos. Además, el etiquetado y la síntesis de sondas fluorescentes orgánicas como posibles fluoróforos son técnicamente exigentes, requieren mucho tiempo y costes significativos; además muchas de las moléculas de colorante orgánico pueden sufrir fotooxidación [49]. Entre los procedimientos reportados, los basados en colorimetría y fluorescencia que explotan la fuerte afinidad de los biotioles por los cationes metálicos y las nanopartículas metálicas tienen ventajas aparentes sobre otros métodos en términos de sensibilidad y facilidad de operación. El desarrollo de sondas de tipo óptico para la detección de biotioles está siendo un área de investigación activa debido a su importancia biológica [27, 91]. La mayoría de los sistemas de detección de tioles biológicos mediante los Cdots involucran iones metálicos, como Hg^{2+} , Ag^+ y Cu^{2+} [68, 70, 94].

La detección selectiva de GSH en presencia de Cys sigue siendo un desafío, ya que todos los biotioles tienen un comportamiento químico parecido porque incorporan grupos tiol, carboxílicos y amino [68, 94].

1.3. ¿Cómo se determinan los biotioles mediante los Cdots?

Los Cdots han mostrado un gran potencial en biosensores y bioimagen como nuevo nanomaterial luminiscente. Los avances logrados recientemente promueven su aplicación práctica en la detección de analitos de interés químico/biológico. Hasta la fecha, varios artículos han reportado sistemas para la detección fluorescente de GSH basada en Cdots [94]. Incluso se ha reportado el uso de Cdots como catalizadores miméticos de la peroxidasa en un sensor colorimétrico para GSH que tiene aplicaciones prácticas [26]. Los Cdots podrían ser los nanomateriales más prometedores para cuantificar la concentración de GSH incluso en trazas [28, 29]. Por lo tanto, existe un gran interés en desarrollar nuevos ensayos selectivos de GSH basados en Cdots biocompatibles, teniendo en cuenta que la investigación sobre ensayos basados en Cdots para la detección de GSH se encuentran en una etapa muy temprana [28, 94]. Aun así, no faltan ejemplos de sensores químicos para detección del GSH que están basados en Cdots. Por ejemplo, los Cdots codopados con nitrógeno y azufre (N,S-CQD) sintetizados a partir de L-Cys y una disolución acuosa de amoníaco mostraron una alta selectividad hacia el glutation incluso entre otros biotioles, como Cys y Hcy. Las interacciones entre glutation y N,S-CQD deben ser de tipo electrostático [68]. Se ha publicado también un interesante quimiosensor de doble canal fluorescente basado en Cdots funcionalizados con BPMA, que puede detectar de forma selectiva el GSH entre sus análogos Cys y Hcy, mediante dos respuestas de fluorescencia distintas de la sonda BPMA-CQDs hacia Cu^{2+} o Ag^+ [94]. Entre los sensores fluorimétricos cuyo mecanismo de detección no se puede clasificar dentro de los tipos tradicionales *turn-off* y *turn-on*, se ha reportado un sensor de fluorescencia que se basa en el control del grado de pasivación de la superficie de Cdots para la detección de GSH. Por cierto, se encontró que la intensidad de la fluorescencia de los Cdots obtenidos pirolizando directamente el ácido cítrico (AC) aumentaba en gran medida después del tratamiento de pasivación de la superficie con 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) [29].

Hasta ahora, la mayoría de los biosensores de tipo óptico se basan en la atenuación de la fluorescencia de los Cdots activados por los analitos, y estos sensores ópticos de tipo *turn-off* son vulnerables a las interferencias. Por lo tanto, se necesitan más estudios para explorar el potencial completo de los Cdots en el desarrollo de sensores inteligentes avanzados [91]. También se ha publicado un tipo de Cdots obtenidos a partir de AC y reactivo de Biuret. Como biosensores fluorimétricos sin etiqueta, son capaces de una detección rápida y sensible de Hg^{2+} y L-Cys en un amplio rango de concentraciones. La detección de Hg^{2+} se basa en su efecto de atenuación de la fluorescencia de los Cdots, mientras que la detección de L-Cys se debe a la unión entre L-Cys y Hg^{2+} a través de un enlace entre el grupo tiol (SR) de la Cys molecular y el catión metálico Hg^{2+} . L-Cys interactúa con Hg^{2+} preferentemente que con los Cdots y elimina Hg^{2+} de la superficie de los Cdots, por lo que puede restablecerse la fluorescencia del sistema. Además, este sensor basado en Cdots ha sido utilizado para la identificación visual y la cuantificación de Hg^{2+} y L-Cys en muestras reales de agua y aplicado con éxito para imágenes de fluorescencia de las células NIH-3T3 [48]. Otro sensor de fluorescencia se basa en un tipo de Cdots dopados con nitrógeno. Esas nanopartículas pueden formar un complejo estable no fluorescente con el ion mercurio (NCD- Hg^{2+}). Luego, la fluorescencia del sistema NCD- Hg^{2+} puede ser recuperada completamente con la adición de L-Cys debido a la disociación del complejo NCDs- Hg^{2+} y a la formación de otro complejo más estable entre mercurio y L-Cys. Por lo tanto, tales Cdots dopados con nitrógeno pueden usarse como una sonda fluorescente de tipo *turn-off* efectiva para la detección rápida, bastante selectiva y sensible de Hg^{2+} . Curiosamente, ese sistema NCDs- Hg^{2+} puede emplearse convenientemente como un sensor *turn-on* fluorescente para la detección altamente selectiva y sensible de L-Cys [80]. Otro sensor para detección fluorimétrica de mercurio y cisteína se basa en Cdots co-dopados con magnesio y nitrógeno (Mg-N-CQD) [52].

1.3.1. Uso del ion Hg^{2+} para la detección de biotioles mediante Cdots

Como ha sido indicado anteriormente, los Cdots han sido usados para detectar iones metálicos, tales como Hg^{2+} , aprovechando la atenuación de su luminiscencia tras la interacción con los cationes metálicos.

Entre esos, hay que destacar el Hg^{2+} , que es el catión que presentó la afinidad más alta con los Cdots en los sistemas sensores estudiados en esta Tesis Doctoral, o sea el más adecuado para ser usado para detectar biotioles en esos mismos (bio)sensores fosforimétricos, y también por la importancia que presenta su detección en el medio ambiente y en sistemas biológicos. Efectivamente, el catión Hg^{2+} resulta ser la forma inorgánica más estable del mercurio, siendo uno de los contaminantes más peligrosos y omnipresentes. Hg^{2+} está considerado como uno de los cationes más peligrosos y tóxicos para la salud humana, ya que presenta la característica de la bioacumulación, o sea puede finalmente acumularse en el cuerpo como resultado de beber agua contaminada o comer alimentos contaminados [52, 80]. Por ejemplo, el nivel de concentración máxima recomendado de Hg^{2+} en el agua potable es de $0,002 \text{ mg L}^{-1}$ ($9,97 \text{ nmol L}^{-1}$). El mercurio absorbido puede ocasionar incluso a bajas concentraciones daño cerebral, insuficiencia renal, pérdida de visión y audición, trastornos del sistema nervioso, y finalmente la muerte [41]. El conocido caso de la enfermedad de Minamata, síndrome neurológico grave y permanente causado por un envenenamiento por mercurio, descrita por primera vez en Japón en 1956, subrayó la necesidad de métodos analíticos para la detección de Hg^{2+} que fueran baratos y rápidos. Recientemente, para la detección de Hg^{2+} fueron empleados nanomateriales basados en metales nobles, ADNzimas, proteínas, pequeñas moléculas orgánicas fluorescentes, QDs y finalmente los Cdots [52]. Aquí trataré sobre los sistemas de detección de Hg^{2+} basados en Cdots. ¿Qué tipo de interacción química están en la base de esos sistemas de detección? Este fenómeno puede atribuirse a la interacción entre Hg^{2+} y los grupos carboxilato, hidroxilo y amino de los Cdots. Esa fuerte afinidad de unión junto con una cinética de quelación rápida cambian la estructura electrónica de los Cdots y afectan a la distribución de los excitones. Eso da lugar a un mecanismo de transferencia de carga que acelera la recombinación no radiativa de los excitones a través de un proceso efectivo de transferencia de electrones, lo que lleva a una disminución sustancial de la fluorescencia de los Cdots [52,80]. Si bien los sistemas de detección demostraron buena sensibilidad y selectividad, normalmente no es así, dado que los sistemas *turn-off* suelen tener el inconveniente de las interferencias, lo que conlleva una baja selectividad. Además, se ha explotado la mayor afinidad de unión del Hg^{2+} con los biotioles con respecto a los Cdots y así lograr un (bio)sensor de tipo *turn-off/turn-on* que aparte de la

posibilidad de la detección de dos analitos presenta normalmente una mayor selectividad con respecto a un sistema de un solo canal.

El proceso de recuperación de la luminiscencia fue debido a la formación del enlace Hg^{2+} -SR, que fue mucho más fuerte que la interacción electrostática entre Hg^{2+} y los Cdots [80]. Por lo tanto, los cationes Hg^{2+} tendieron a liberarse mediante un proceso de desorción reversible de la superficie de los Cdots a medida que aumenta la concentración de Cys provocando un cambio de luminiscencia *off-on* de los Cdots. Por otro lado, debido a la fuerte capacidad reductora de la Cys, el Hg^{2+} se redujo a mercurio elemental (Hg^0) durante la reacción de combinación [41].

1.4. Interés en el desarrollo de sensores fosforimétricos para la determinación de los biotioles

Las reacciones específicas entre las sondas ópticas y los tioles se asociaron con el marcado aumento/disminución de las señales fluorescentes o colorimétricas. Esto hizo que la detección fuera principalmente de tipo fluorimétrico o colorimétrico; menos comunes fueron los sistemas sensores basados en fosforimetría, por la menor frecuencia con la que ese fenómeno ocurre con respecto a la fluorescencia o a la absorción. La detección mediante la fosforescencia a temperatura ambiente (RTP) atrajo mucha atención cuando fue descubierta debido a sus ventajas, como la mayor separación entre los espectros de excitación y emisión, el tiempo de vida más largo, ausencia de interferencia de la autofluorescencia y de la luz dispersada. Se ha reportado sobre una serie de métodos de RTP basados en atenuación de la fosforescencia de QDs, tales como el sistema híbrido MPA-Mn: ZnS QDs-KMnO₄, basado en un mecanismo redox. Ese sensor fue empleado como interruptor fosforescente *turn-off/ turn-on* para la detección fácil, sensible y selectiva de GSH en alimentos, vino y muestras biológicas [28, 41]. Actualmente son muy pocas las aplicaciones de la fosforimetría en sensores basados en Cdots, a pesar de las ventajas proporcionadas, como son una síntesis sencilla, baja emisión de fondo y mejoras en la selectividad de la detección por el retraso que existe entre el tiempo de medida respecto a la excitación. Además, son pocos los compuestos que fosforescen en comparación con los que tienen fluorescencia o absorben la radiación [112].

Aun así, los sensores de tipo fosforimétricos presentan una mejor selectividad en la detección y un mayor interés para publicación y patentabilidad.

2. Objetivos

El objetivo del trabajo de investigación que se presenta en este capítulo consiste en el desarrollo de un método de detección óptica basado en las propiedades luminiscentes de los Cdots, capaz de monitorizar *in situ*, en tiempo real y en entornos o microentornos la concentración de biotioles, concretamente Cys, Hcy y GSH.

Para lograr el objetivo general se abordaron los siguientes objetivos concretos:

- Síntesis y caracterización de los Cdots.
- Desarrollo de procedimientos analíticos para la determinación de biotioles mediante los Cdots sintetizados.

3. Síntesis y funcionalización de los Cdots

Las diferentes técnicas propuestas para realizar la síntesis de Cdots se recogen en recientes revisiones [7]. La mayor parte de aplicaciones en biomedicina hacen uso de Cdots libres, esto es en suspensión coloidal, que se obtuvieron cuando se emplearon rutas sintéticas conocidas como *bottom-up*, a partir de moléculas precursoras: fuentes de carbono tales como AC, ácido fenilborónico, glucosa, *etc.* De esas rutas, fue seguida la hidrotermal, asequible en nuestro laboratorio y conocida por los integrantes del grupo de investigación.

Concretamente, se llevaron a cabo tres tipos de síntesis distintas, todas ellas de un solo paso, para preparar Cdots solubles en agua:

Síntesis 1. El primero fue a partir de una solución acuosa de AC en presencia de etilendiamina (EDA) durante 5 horas a 200 °C, de acuerdo con la literatura [52]. Primero, el AC (420 mg) fue disuelto en agua. A continuación, fue añadida la EDA (535 µL).

La mezcla resultante fue introducida en una bomba hidrotermal de acero forrada de Teflón. La bomba fue puesta en un horno a 200 °C durante 5 horas, para que tuviera lugar la reacción hidrotermal. Los Cdots sintetizados fueron guardados hasta su uso. La reacción de la EDA como reactivo de pasivación de la superficie proporcionó átomos de nitrógeno [52] que con los grupos -COOH de la superficie de los Cdots, permitió una modificación covalente de los Cdots que amplió la funcionalidad y las aplicaciones de este material. Fue estimado un rendimiento del 9,6%.

Síntesis 2. Han sido utilizados como precursores una solución acuosa de AC e hidróxido de magnesio en presencia de EDA a 150 °C durante 8 horas. Brevemente, el AC (1 g) y el hidróxido de magnesio (0,5 g) fueron disueltos en agua (1 mL). El hidróxido de magnesio fue elegido como agente de quelación para proteger los grupos carboxilo del AC durante el procedimiento de deshidratación y carbonización [50]. A continuación, fue añadida la EDA (0,5 mL). La mezcla resultante se transfirió a una autoclave de acero inoxidable forrada de Teflón. La bomba fue puesta en un horno a 150 °C durante 8 horas, para que ocurriera el proceso hidrotermal. A continuación, la autoclave se enfrió a temperatura ambiente y la suspensión coloidal de Cdots fue recuperada, centrifugada (3.500 RPM, 10 minutos) y sometida a diálisis en membrana de 1 kD para su ulterior purificación, durante por lo menos 24 h y cambiando el agua tres veces. Los Cdots fueron guardados hasta su uso. Fue estimado un rendimiento del 0,7%.

Síntesis 3. Mientras, los Cdots 3 fueron sintetizados a partir de una disolución de 10 g de AC en 10 mL de agua, a la que fueron añadidos a continuación 5 mL de EDA. La mezcla resultante fue depositada en una bomba hidrotermal de acero forrada de Teflón. La autoclave fue puesta en un horno a 180 °C durante 8 horas, para que ocurriera el proceso hidrotermal. El sobrenadante con los Cdots fue sometido a purificación como se describe más arriba. Fue estimado un rendimiento del 0,2%. Dos alícuotas de la suspensión resultante de Cdots tras su purificación fueron filtradas a través de una membrana microporosa de 0,2 µm.

4. Caracterización de los Cdots

Una vez sintetizados los Cdots, antes de optimizar sus propiedades luminiscentes se decidió caracterizarlos adecuadamente. A tal fin, fue calculado su peso seco, y fueron registrados también los espectros de absorción y de luminiscencia de los Cdots. A continuación, fueron reportados los resultados obtenidos.

4.1. Cálculo del peso seco de los Cdots

El peso seco de los Cdots 1 fue calculado en miligramos por mililitro de disolución. Fue encontrado que los Cdots 1 tenían un peso seco de $86,86 \text{ mg mL}^{-1}$. El peso seco de los Cdots 2 y 3 fue calculado de la misma manera, logrando caracterizar un peso seco de $14,23 \text{ mg mL}^{-1}$ y $4,30 \text{ mg mL}^{-1}$ para los Cdots 2 y 3, respectivamente. También hubo que señalar que un lote de Cdots 3 sintetizado en un segundo momento tuvo una concentración de $572,27 \text{ mg mL}^{-1}$, según el cálculo del peso seco. Sin embargo, esos Cdots apenas fueron usados en los experimentos reportados en este capítulo. Fueron empleados en experimentos descritos en los capítulos sucesivos.

4.2. Caracterización espectroscópica de los Cdots

Antes de registrar los espectros de luminiscencia de los Cdots, fueron preparadas las disoluciones de Cdots 1 y 2. Entonces, la disolución madre fue preparada dispersando los Cdots ($10 \text{ }\mu\text{L}$) en agua (6 mL). Luego, una alícuota de la disolución de Cdots así preparada ($70 \text{ }\mu\text{L}$) se diluyó a 6 mL con tampón fosfato (dihidrógenofosfato de sodio/monohidrógenofosfato de sodio $0,02 \text{ M}$, $\text{pH } 7,4$) para lograr una concentración final de $2,8 \times 10^{-3} \text{ mg mL}^{-1}$ de Cdots. Antes de realizar experimentos con los Cdots, fue registrado el espectro de absorción de una alícuota (3 mL) de esta disolución de Cdots para poder establecer los parámetros de su luminiscencia. Los Cdots preparados mostraron un espectro de absorción ultravioleta-visible (UV-Vis) con una banda a 350 nm (Figura 2).

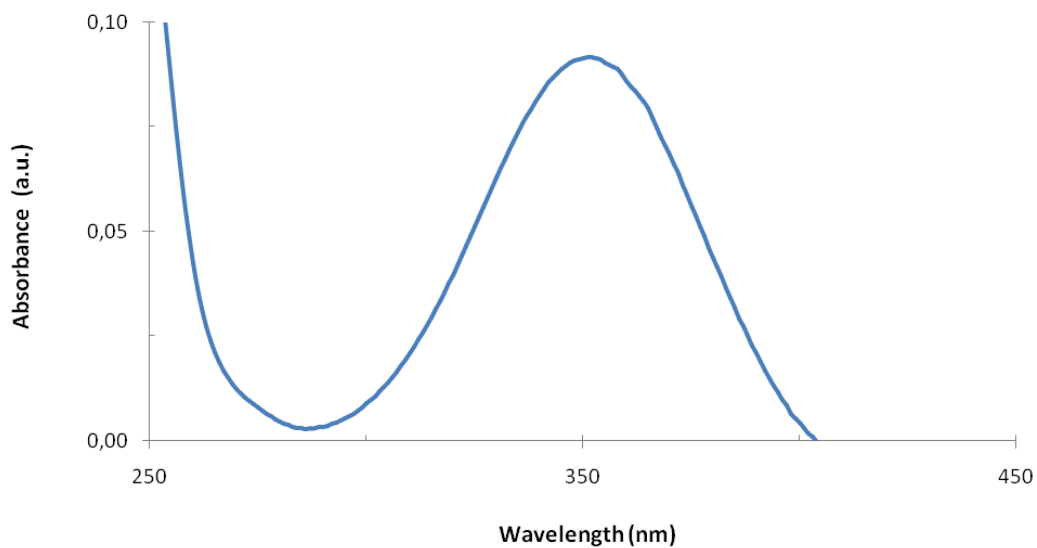


Figura 2. Espectro de absorción de los Cdots.

Según estudios anteriores, los Cdots exhibieron luminiscencia azul bajo luz de excitación ultravioleta (UV) a una longitud de onda de 350 nm. Esa banda puede atribuirse a la transición $n - \pi^*$ de los enlaces C=O [65, 84]. La banda de absorción es indicativa del sistema aromático π con conjugación extendida en las estructuras de los Cdots, donde se atribuyeron a la transición $n-\pi^*$ del enlace C = N o C = O, de una manera parecida a otros Cdots encontrados en la literatura [52, 113, 114].

A continuación, fueron registrados los espectros de luminiscencia de esa disolución (Figura 3). Se puede observar una banda con un máximo a 442 nm.

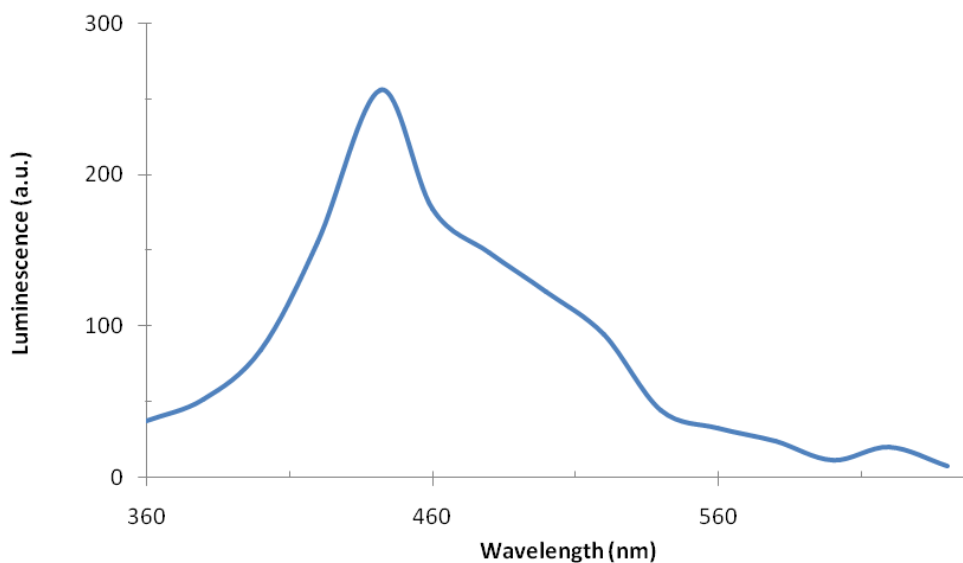


Figura 3. Espectro de luminiscencia de la disolución de los Cdots 1. Longitud de onda de excitación $\lambda = 340$ nm (ver Capítulo II, Apartado 4.1).

A pesar de que la forma del espectro fuese muy parecida entre los dos tipos de Cdots, la intensidad de luminiscencia de los Cdots 2 fue mucho más alta con respecto a la de los Cdots 1. Efectivamente, un máximo de 680 a.u. fue encontrado alrededor de la longitud de onda de 442 nm (Figura 4). El aumento de intensidad con respecto a la registrada para los Cdots 1 fue del 266 %.

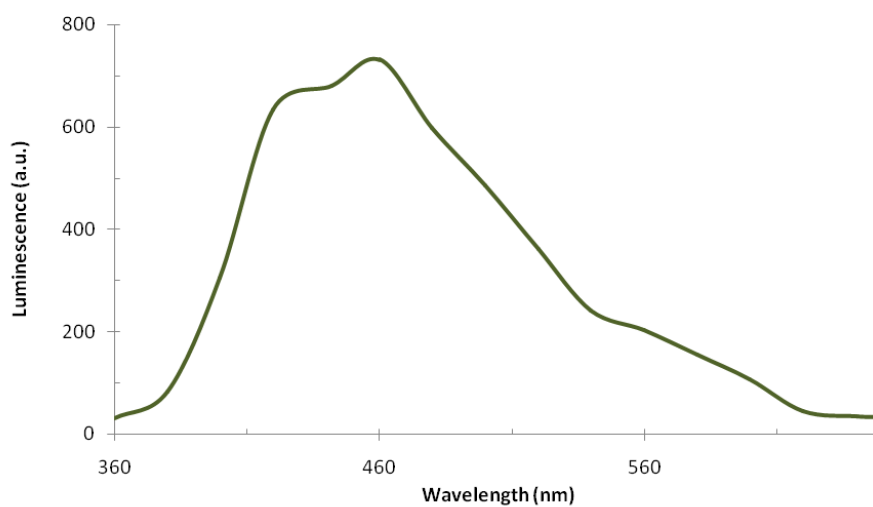


Figura 4. Espectro de luminiscencia de los Cdots 2.

Fueron obtenidos también los espectros RTP de excitación y emisión de otra disolución con una concentración $5,6 \times 10^{-3} \text{ mg mL}^{-1}$ de Cdots 2 (Figura 5).

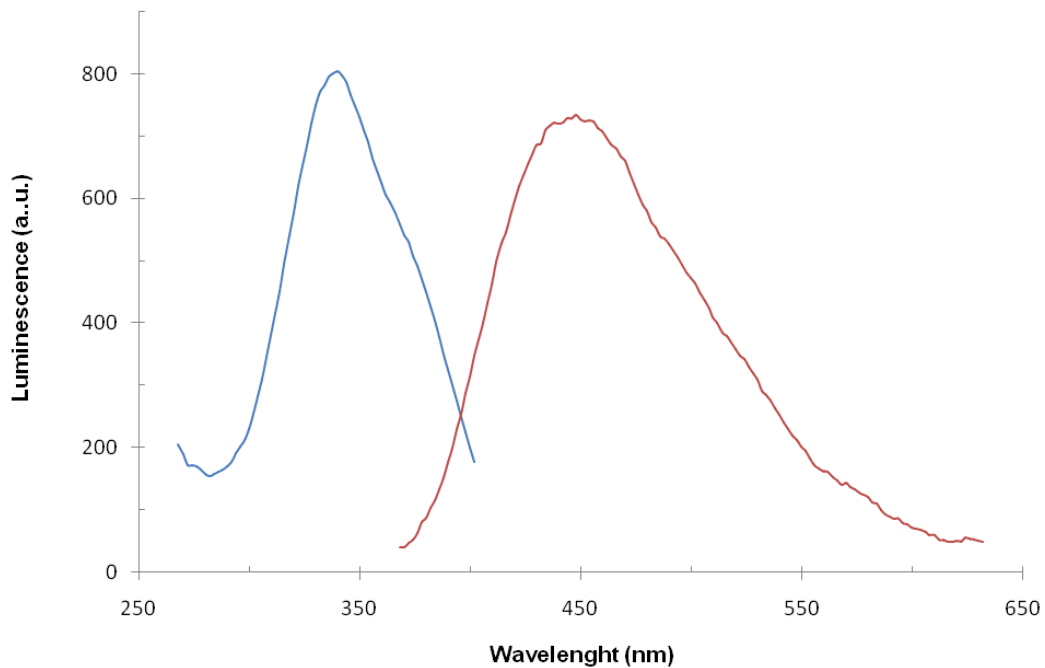


Figura 5. Espectros RTP de excitación y emisión de los Cdots 2. El tiempo de retraso (delay) ha sido establecido en 0,150 ms. Las rendijas de entrada y salida fueron ajustadas a 20 nm (ver ver Capítulo II, Apartado 4.1).

Se pudo apreciar la baja emisión de fondo y el retraso que permitió en el tiempo de medida respecto a la excitación.

Para la mayoría de los Cdots, la longitud de onda de emisión dependió de la longitud de onda de excitación, es decir, con el aumento de la longitud de onda de excitación, la banda de emisión máxima se desplazó a una longitud de onda más larga y la intensidad máxima disminuyó [26, 29]. Esto se atribuyó a la distribución de los diferentes sitios de captura emisiva, es decir las trampas de energía en la superficie de los Cdots [27, 70].

5. Optimización del sistema de detección de los biotioles basados en Cdots

Una vez sintetizados y caracterizados los Cdots, llegó el momento de analizar sus propiedades luminiscentes y optimizarlas para poder usar los Cdots en la detección de los biotioles. En primer lugar, la concentración de los Cdots fue optimizada a partir de una disolución madre de Cdots en agua, para que su luminiscencia pudiera ser medida experimentalmente sin ser afectada por la autoabsorción. Luego, fue examinada la estabilidad de la luminiscencia de los Cdots, que fue establecida en 40 minutos. Se sabe que el comportamiento luminiscente de los Cdots sufre una dependencia del pH, por lo tanto, fue estudiada dicha influencia del pH. Entre el tampón Tris-HCl a pH 7,5 y el tampón fosfato 20 mM a pH 7,4, se escogió este último. Después se comprobó que a pH 7,4 los Cdots presentaron propiedades luminiscentes más significativas. Al contrario, las pruebas realizadas demostraron que no hubo una influencia significativa de la fuerza iónica de la disolución sobre las propiedades luminiscentes de los Cdots. Finalmente, los Cdots fueron ensayados frente a varios iones metálicos, para observar una posible interacción que pudiera atenuar su luminiscencia. Concretamente, entre Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Al^{3+} y Hg^{2+} fue ese último el que produjo una atenuación más significativa y dependiente de forma lineal con el aumento de su concentración, por lo tanto, el ion Hg^{2+} fue escogido para ser parte de un sistema de detección de los biotioles junto a los Cdots.

5.1. Concentración de los Cdots

La concentración de los Cdots utilizados debió seleccionarse cuidadosamente para aplicaciones prácticas. Hubo que tener en cuenta que la atenuación por autoabsorción se ha observado a menudo en los materiales luminiscentes de carbono. Cuando la concentración fue lo suficientemente alta, se produjo una atenuación por colisión y la intensidad de la fotoluminiscencia disminuyó [80]. Fue preparada una disolución madre de los Cdots (10 μL) en agua (6 mL). A continuación, fueron preparadas cuatro diluciones de esta disolución madre:

- 1) 0,2 mL madre, 500 μL de tampón fosfato, 5300 μL agua.
- 2) 0,4 mL madre, 500 μL de tampón fosfato, 5100 μL agua.

- 3) 1,0 mL madre, 500 μL de tampón fosfato, 4500 μL agua.
- 4) 1,4 mL madre, 500 μL de tampón fosfato, 4100 μL agua.

Cada disolución fue dividida en dos alícuotas. A una fue añadido Hg^{2+} 50 μM (30 μL); a la otra, una cantidad igual de agua (blanco). Fueron obtenidos los resultados siguientes: 1) $I/I_0 = 121/265$ a.u. = 0,457; 2) $I/I_0 = 168/369$ a.u. = 0,455, 3) $I/I_0 = 252/537$ a.u. = 0,469; 4) $I/I_0 = 323/633$ a.u. = 0,510, siendo I_0 e I la intensidad de luminiscencia antes y después de la adición de mercurio, respectivamente. Las muestras a la que fue añadido el blanco tuvieron valores que no difirieron de manera significativa del I_0 . Como vemos la atenuación es mayor con la disolución de Cdots más concentrada por lo que fueron seleccionadas las condiciones de la muestra 4 para todos los restantes experimentos.

5.2. Estabilidad de la luminiscencia de los Cdots

En los ensayos de estabilidad de la luminiscencia de los Cdots, primero fue añadida una concentración constante (49 μM) de Hg^{2+} 5 mM (30 μL) a las alícuotas de la disolución de Cdots. Se decidió medir las muestras después de 30 minutos de incubación. Luego, fue adicionada una concentración constante (50 μM) de una disolución 5 mM (30 μL) de biotioles (L-GSH o L-Cys). Hay que destacar que las muestras fueron siempre dejadas en el frigorífico tras la adición del analito GSH, que se puede estropear a temperatura ambiente. A continuación, fueron realizadas las medidas del tiempo de reacción, según el protocolo establecido. A concentración constante de biotiol, la intensidad de luminiscencia de los Cdots aumentó hasta los 40 minutos (Figura 6). Pasado este tiempo, empezó a disminuir. Por lo tanto, el tiempo para alcanzar una señal estable de la luminiscencia de los Cdots fue establecido en 40 minutos.

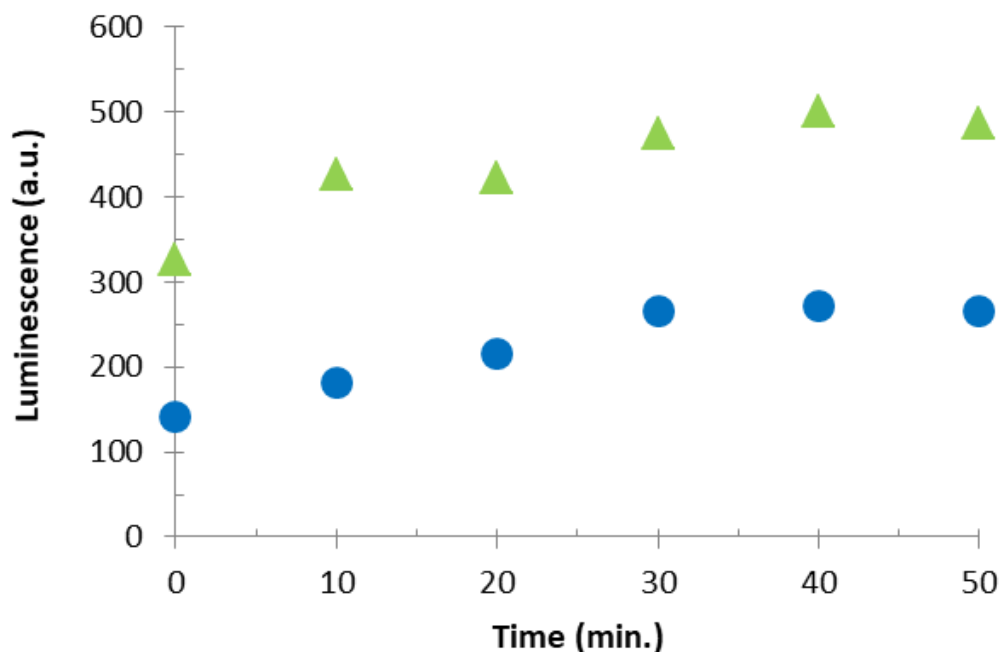


Figura 6. Intensidad de luminiscencia a concentración constante (50 μM) de los biotioles L-Cys (azul) y L-GSH (verde), a partir de una solución Cdots/ Hg^{2+} 50 μM .

5.3. Dependencia del pH en el comportamiento luminiscente de los Cdots

Para estudiar la influencia del pH se utilizó el tampón fosfato. Para ello se prepararon tampones fosfato de pH comprendido entre 1,5 y 12,5 y se operó de la forma siguiente. La disolución de Cdots fue preparada con 70 μL de su disolución madre, 1 mL de tampón fosfato de pH en el rango 1,5-12,5 llevando con agua hasta un volumen de 6 mL. Los espectros fueron registrados en las condiciones establecidas. Luego, fueron añadidos 60 μL de Hg^{2+} 5 mM (98 μM) a las muestras dejándolo incubar durante 10 minutos tras lo cual se volvió a registrar el espectro. Finalmente, fue añadida una alícuota (120 μL) de L-Cys con lo que la concentración de analito resulta ser 196 μM . Las muestras fueron dejadas en incubación durante 10 minutos y finalmente medidas a las condiciones establecidas. La recuperación más significativa ocurrió cuando fue usado un valor de pH de 7,4. Por lo tanto, se decidió usar el tampón fosfato 20 mM a pH 7,4 en todos los experimentos (Figura 7).

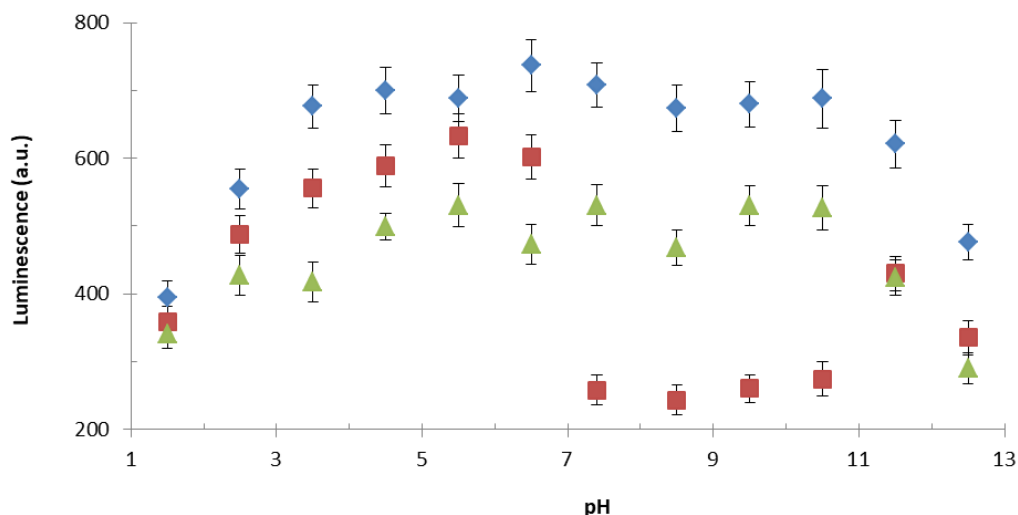


Figura 7. Estudio de la intensidad de luminiscencia en función del pH de una disolución de Cdots solos (en azul), tras adición de Hg²⁺ 98 μM (en rojo) y L-Cys 196 μM (en verde).

Aunque la disolución de Cdots solos presentó una luminiscencia más fuerte a un pH ligeramente ácido (6,5), la atenuación por parte del mercurio fue mínima y la adición de Cys produjo una ulterior disminución de la luminiscencia. Todas esas eran evidencias que a pH ácido no ocurrieron las reacciones entre Cdots y Hg²⁺, y entre ese ion metálico y el aminoácido L-Cys. Mientras que sí ocurrieron a pH superiores a 7,5 aunque con una recuperación de la luminiscencia inferior a la observada a un pH neutro tal como 7,4-7,5. A valores de pH fuertemente básicos (11,5-12,5) los resultados obtenidos sugirieron que la estabilidad del sistema sensor se vio afectada por esas condiciones demasiado drásticas. Efectivamente, a pH bajo, la mayoría de los grupos funcionales deben estar protonados y la competencia de H⁺ con el Hg²⁺ disminuyó el número de sitios activos. Sin embargo, en condiciones alcalinas, el Hg²⁺ reacciona con el OH⁻ para formar el intermediato transitorio Hg(OH)₂, que se convirtió fácilmente en HgO insoluble. En consecuencia, el efecto de atenuación del Hg²⁺ se habría reducido significativamente bajo condiciones ácidas o alcalinas [48].

5.4. Influencia de la fuerza iónica sobre la luminiscencia de los Cdots

La disolución de Cdots fue preparada según el protocolo establecido, dividida en siete alícuotas y diluida al 50 % con una disolución salina de NaCl desde 0,1 hasta 3,0 M.

Como se pudo observar (Figura 8), la fuerza iónica tuvo un efecto relativamente pequeño en la intensidad de la luminiscencia de los Cdots sin una tendencia clara, incluso a una alta concentración, como ha sido reportado previamente en la literatura [48].

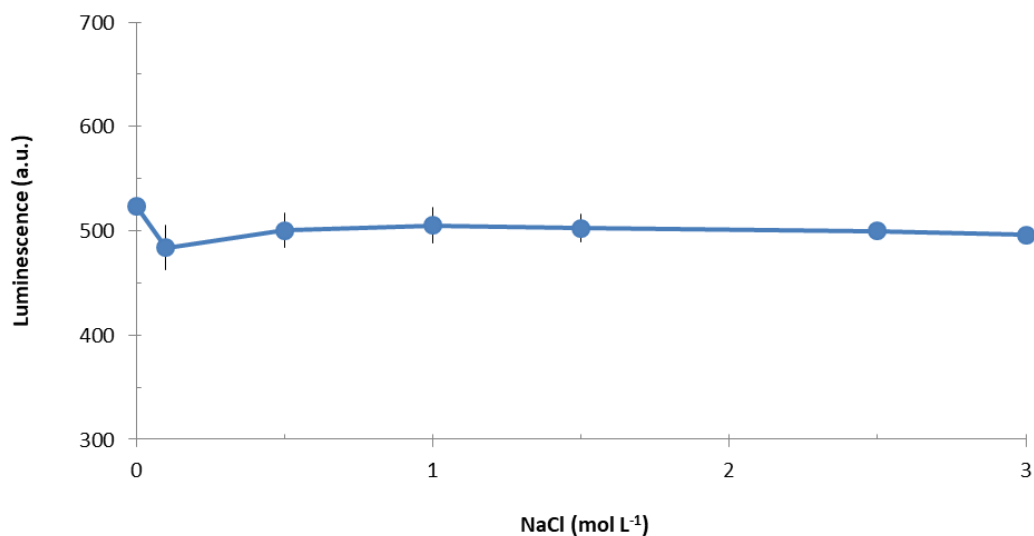


Figura 8. Efecto de la fuerza iónica sobre la intensidad de fosforescencia de los Cdots.

5.5 Optimización de la concentración de iones metálicos

Es sabido que la luminiscencia de los Cdots se ve afectada en presencia de iones metálicos [68, 70, 94]. Normalmente, la interacción con ellos produce una atenuación de la luminiscencia de los Cdots que puede ser usada para detectar los iones metálicos o especies capaces de interactuar con ellos. A tal propósito, se decidió ensayar los Cdots con diferentes iones metálicos, para poder escoger entre ellos el que originase una interacción más fuerte con los Cdots, antes de poder llevar a cabo la detección de los analitos mediante luminiscencia. Entonces, fue preciso realizar un estudio de la influencia de diversos iones metálicos responsables de atenuar su luminiscencia. Los iones metálicos ensayados fueron Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Al^{3+} y Hg^{2+} .

Los experimentos de atenuación de la luminiscencia de los Cdots con metales fueron realizados según los protocolos que se indican a continuación (desde el apartado 5.5.1 hasta el 5.5.5.).

5.5.1. Estudios de la atenuación por Fe^{3+}

Fueron realizados dos estudios de la atenuación por Fe^{3+} , usando como soluciones amortiguadoras el tampón Tris-HCl pH 7,5 y el tampón fosfato 20 mM pH 7,4. En primer lugar, fue preparada una solución 10 mM de $FeCl_3$ en agua. A las alícuotas de los Cdots en disolución acuosa, tamponadas 1:5, fueron añadidos 40 μ M (10 μ L) de la disolución de Fe^{3+} . La fosforescencia fue medida tras 5 minutos de incubación. Los espectros de fosforescencia fueron registrados a las longitudes de excitación y de emisión de 340 nm y 442 nm, respectivamente. El proceso fue repetido hasta llegar a una concentración 196 μ M de Fe^{3+} . A continuación, se pueden observar las gráficas que ilustran las variaciones de la intensidad de luminiscencia a concentraciones crecientes de Fe^{3+} de la disolución de Cdots tamponada a pH 7,5 con Tris-HCl (Figuras 9 y 10).

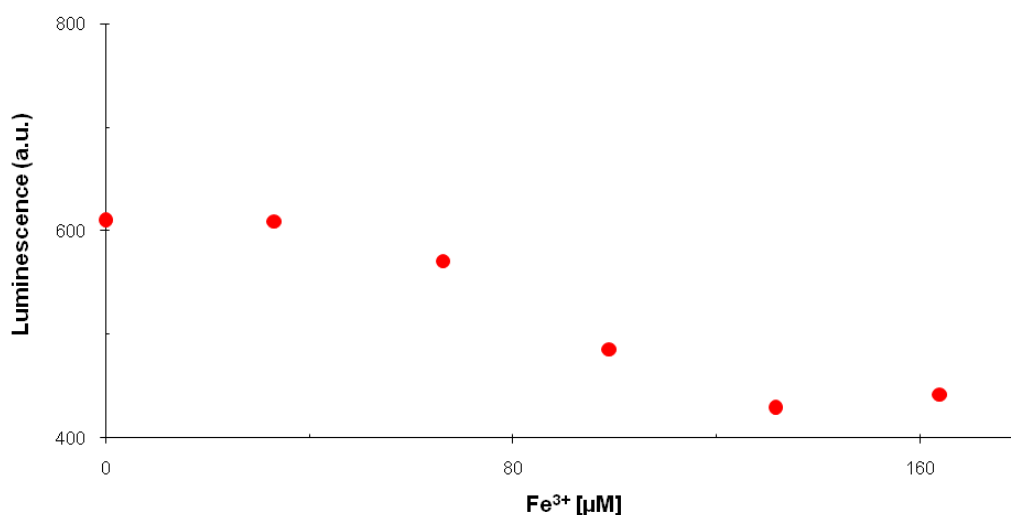


Figura 9. Atenuación de la intensidad de luminiscencia a concentraciones crecientes de Fe^{3+} de una disolución de Cdots 1 (2,5 mL) tamponada con Tris-HCl pH 7,5 (0,5 mL).

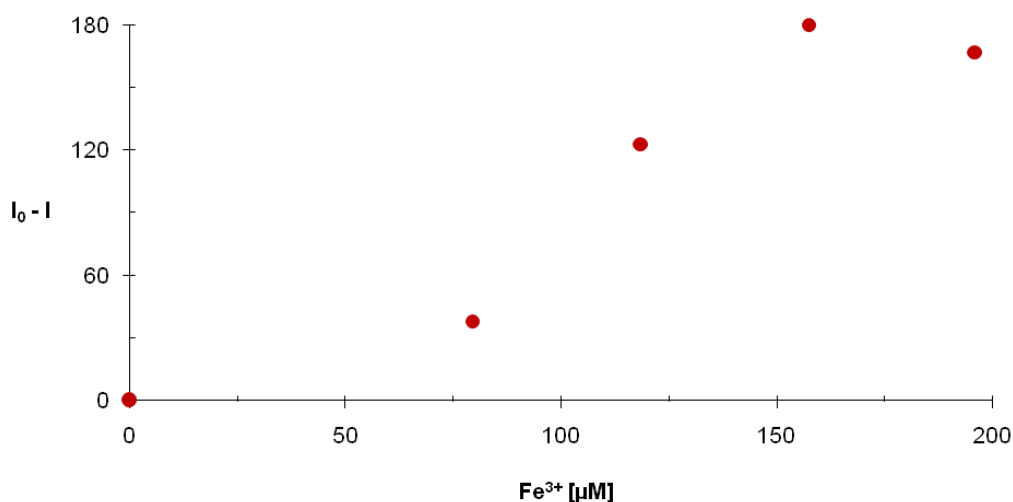


Figura 10. Reducción de la la intensidad de la luminiscencia ($I_0 - I$) de una disolución de Cdots 1 tamponada con Tris-HCl pH 7,5 después de la adición de concentraciones crecientes de Fe^{3+} .

Aunque en las muestras tamponadas con Tris-HCl pH 7,5 la adición de Fe^{3+} a las muestras de Cdots en disolución produjo una atenuación más alta de su luminiscencia con respecto a las muestras tamponadas a pH 7,4 con tampón fosfato 20 mM (Figuras 11 y 12), en ambos casos la atenuación no se pudo considerar de interés comparada con la producida por otros iones metálicos.

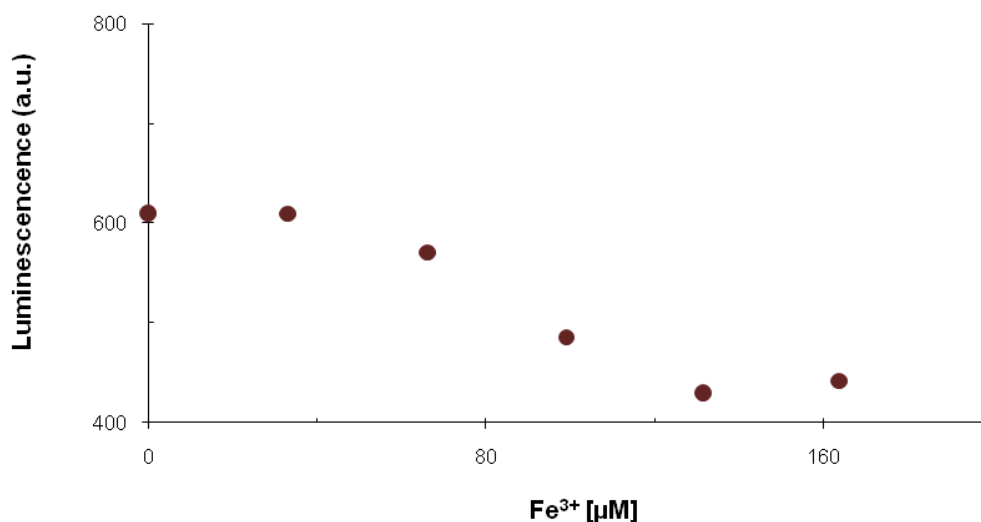


Figura 11. Atenuación de la intensidad de luminiscencia a concentraciones crecientes de Fe^{3+} de una disolución de Cdots 1 (2,5 mL) tamponada a pH 7,4 con tampón fosfato 20 mM (0,5 mL).

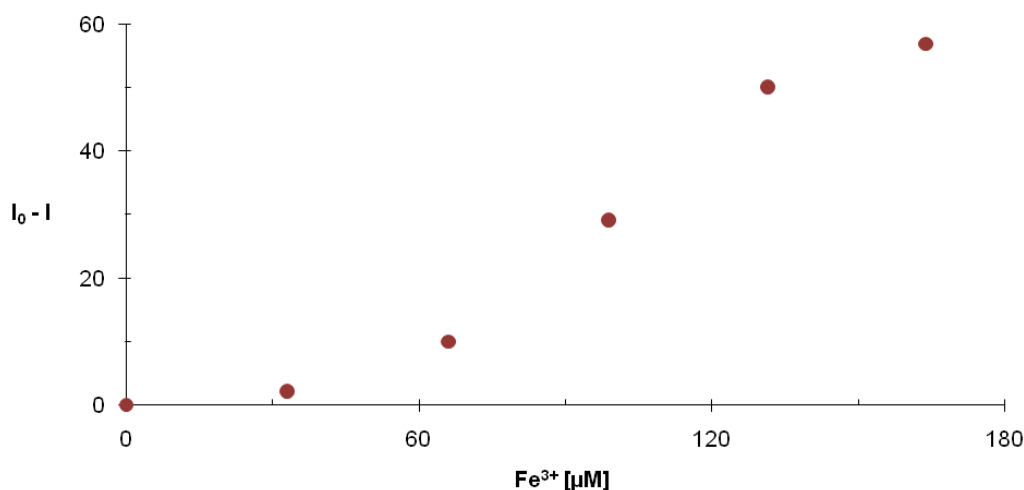


Figura 12. Reducción de la la intensidad de la luminiscencia ($I_0 - I$) de una disolución de Cdots 1 tamponada a pH 7,4 con tampón fosfato 20 mM después de la adición de concentraciones crecientes de Fe^{3+} .

5.5.2. Estudios de la atenuación por Cu^{2+}

A continuación, se estudió el efecto de concentraciones crecientes de Cu^{2+} sobre la intensidad de la luminiscencia de los Cdots, en tampón Tris-HCl pH 7,5 (Figuras 13 y 14) y a pH 7,4 con tampón fosfato 20 mM (Figuras 15 y 16). Fue preparada una disolución de Cu^{2+} 10 mM a partir del respectivo patrón. Fueron añadidas a la disolución de Cdots varias alícuotas (33 μM; 10 μL) a concentraciones crecientes, hasta llegar a una concentración 164 μM de Cu^{2+} .

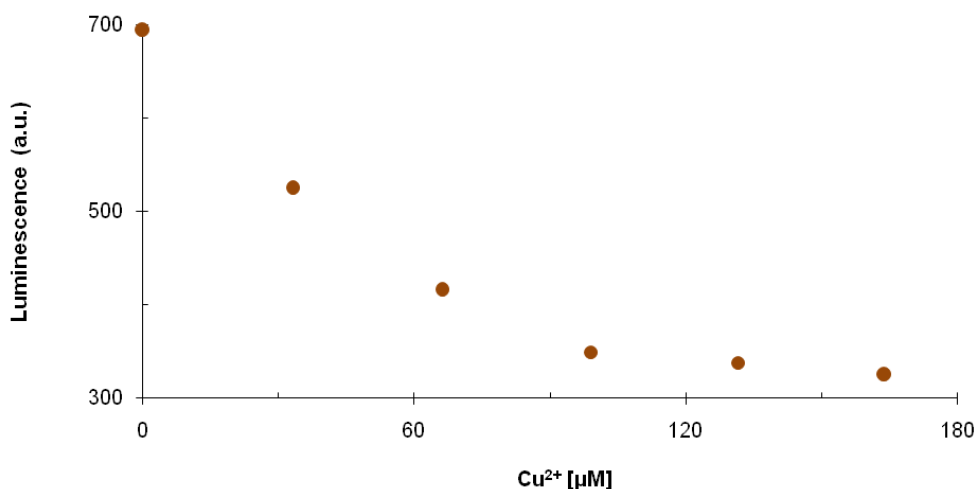


Figura 13. Atenuación originada por Cu^{2+} sobre la intensidad de luminiscencia de una disolución de Cdots 1 tamponada con Tris-HCl pH 7,5.

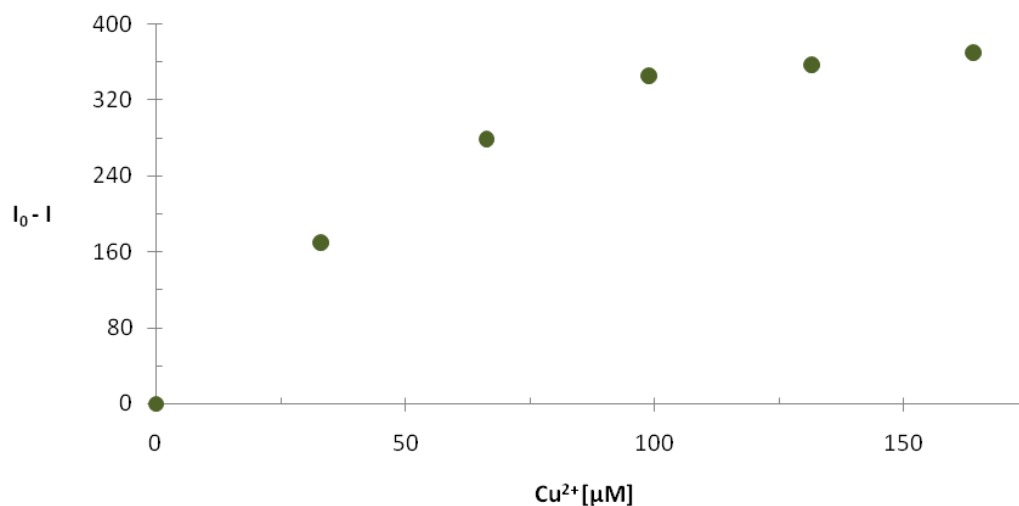


Figura 14. Reducción de la la intensidad de la luminiscencia ($I_0 - I$) de una disolución de los Cdots 1 tamponada con Tris-HCl pH 7,5 tras la adición de Cu^{2+} .

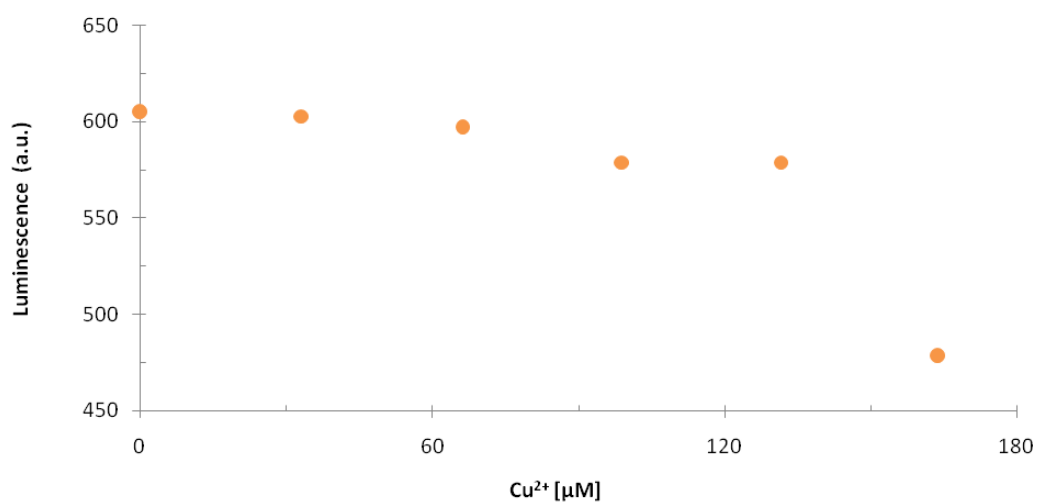


Figura 15. Atenuación originada por Cu^{2+} sobre la intensidad de luminiscencia de Cdots 1 a pH 7,4 con tampón fosfato 20 mM tras adición de Cu^{2+} .

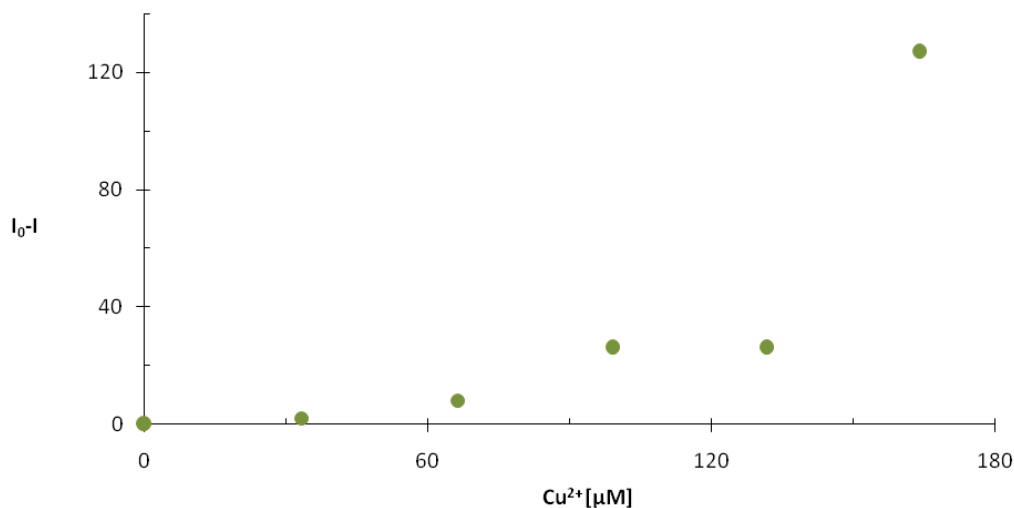


Figura 16. Reducción de la la intensidad de la luminiscencia ($I_0 - I$) de una disolución de Cdots 1 tamponada a pH 7,4 con tampón fosfato 20 mM y tras añadir Cu^{2+} .

La interacción entre Cdots y Cu^{2+} produjo una atenuación más fuerte de la luminiscencia de los Cdots que con Fe^{3+} . En las muestras tamponadas con Tris-HCl pH 7,5 la atenuación significativa fue observada a partir de una concentración 99 μM , mientras que en las que contenían tampón fosfato, la atenuación ocurrió de forma significativa sólo a una concentración relativamente alta de cobre (160 μM).

5.5.3. Estudios de la atenuación por Zn^{2+}

Ha sido estudiado también el efecto del ión Zn^{2+} sobre las propiedades luminiscentes de una disolución de Cdots, tamponada con Tris-HCl a pH 7,5 (Figuras 17 y 18) y con tampón fosfato 20 mM a pH 7,4 (Figuras 19 y 20). Para ello, fue preparada una disolución 10 mM de Zn^{2+} a partir del respectivo patrón. Fueron añadidas a la disolución de Cdots varias alícuotas (33 μM ; 10 μL) de Zn^{2+} a concentraciones crecientes, hasta llegar a una concentración 164 μM .

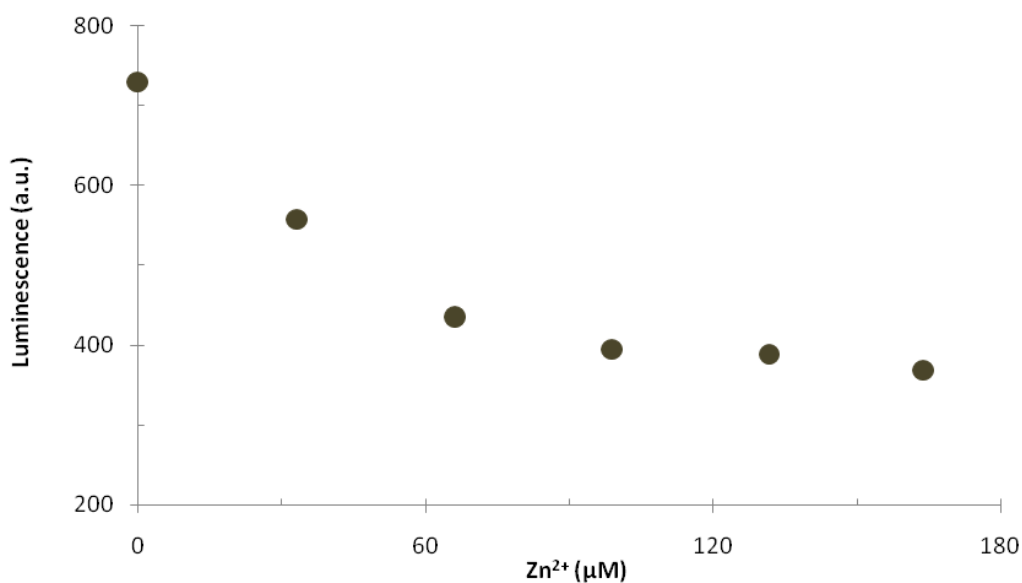


Figura 17. Atenuación originada por Zn²⁺ sobre la intensidad de luminiscencia de Cdots 1 a pH 7,5 con tampón Tris-HCl mM tras adición de Zn²⁺.

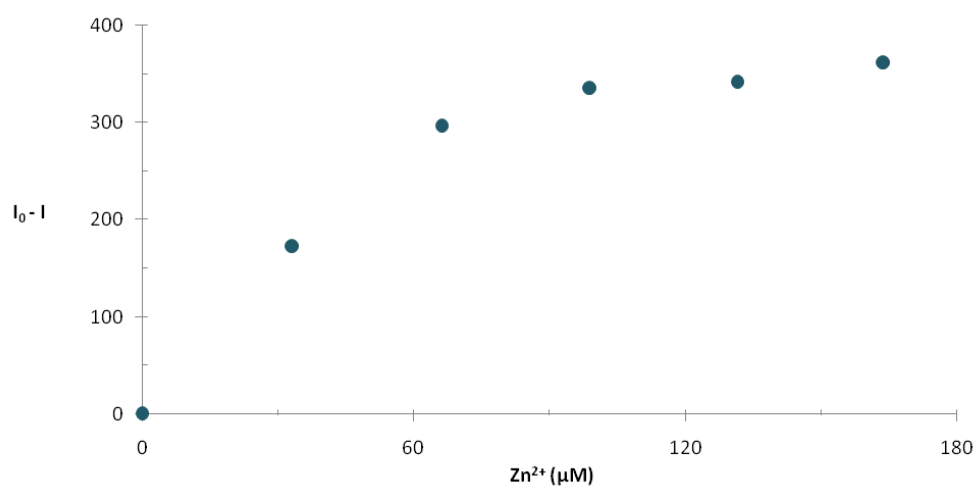


Figura 18. Reducción de la la intensidad de la luminiscencia ($I_0 - I$) de una disolución de Cdots 1 tamponada con Tris-HCl pH 7,5 antes y después de la adición de Zn²⁺.

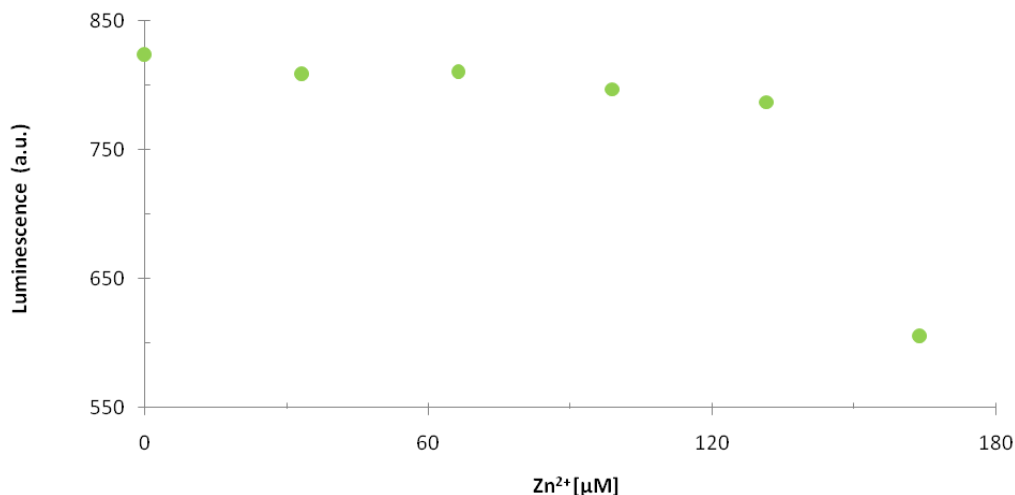


Figura 19. Atenuación originada por Zn²⁺ sobre la intensidad de luminiscencia de Cdots 1 a pH 7,4 con tampón fosfato 20 mM tras adición de Zn²⁺.

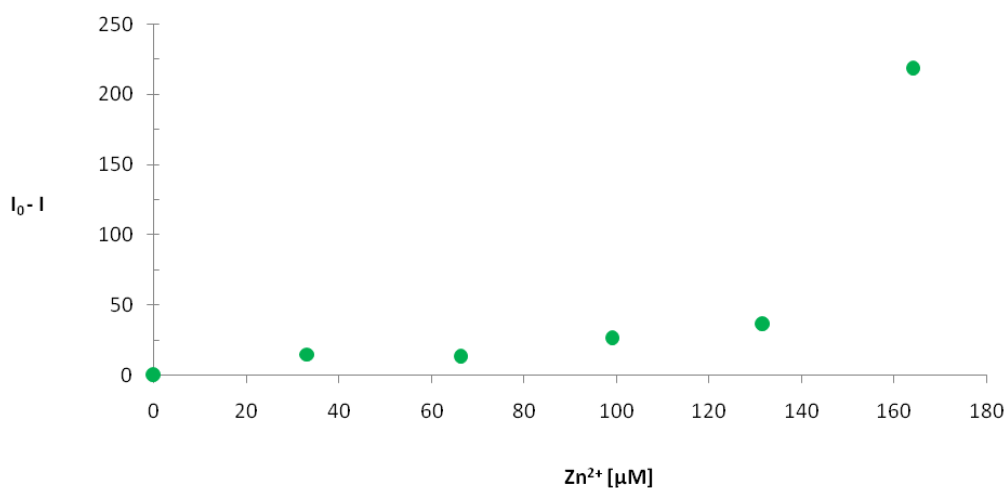


Figura 20. Reducción de la la intensidad de la luminiscencia ($I_0 - I$) de una disolución de Cdots 1 tamponada a pH 7,4 con tampón fosfato 20 mM antes y después de añadir concentraciones crecientes de Zn²⁺.

Se pudo observar que se produjo atenuación de la luminiscencia de los Cdots en las muestras tamponadas a pH 7,5 con Tris-HCl tras la adición de Zn²⁺. La diferencia de intensidad resultó significativa a concentraciones del ion metálico por encima de 90 µM.

Mientras, en las muestras tamponadas a pH 7,4 con tampón fosfato, se pudo observar cómo la atenuación de la luminiscencia de los Cdots en presencia de iones Zn^{2+} ocurrió sólo a concentraciones mayores de 164 μM .

5.5.4. Estudios de la atenuación por Al^{3+}

Ha sido estudiado también el efecto del ion Al^{3+} en la intensidad de luminiscencia de la disolución de Cdots tamponada a pH 7,5 con Tris-HCl (Figuras 21 y 22) y a pH 7,4 con tampón fosfato 20 mM (Figuras 23 y 24). Fue preparada una disolución 10 mM de Al^{3+} a partir del respectivo patrón. Fueron añadidas a la disolución de Cdots varias alícuotas (33 μM ; 10 μL) de Al^{3+} a concentraciones crecientes, hasta llegar a una concentración 164 μM .

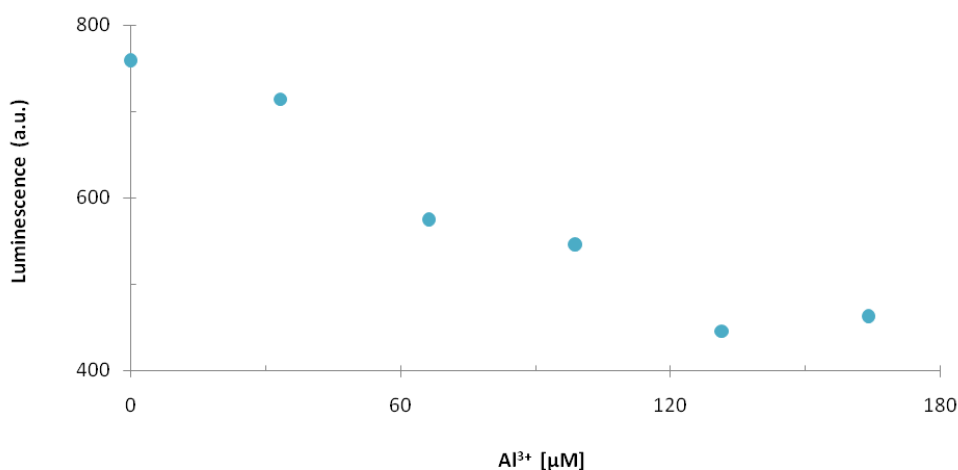


Figura 21. Atenuación originada por Al^{3+} sobre la intensidad de luminiscencia de Cdots 1 a pH 7,5 con tampón Tris-HCl mM tras adición de Al^{3+} .

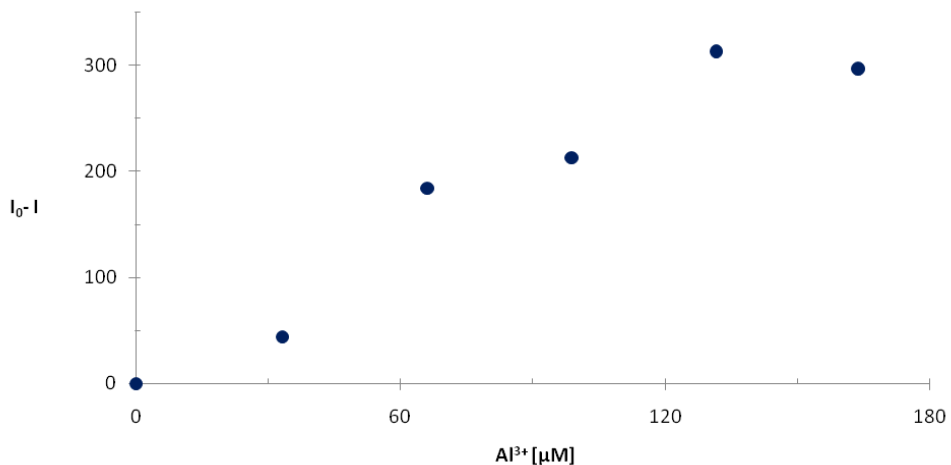


Figura 22. Reducción de la la intensidad de la luminiscencia ($I_0 - I$) de una disolución de Cdots 1 tamponada con Tris-HCl pH 7,5 antes y después de la adición de concentraciones crecientes de Al^{3+} .

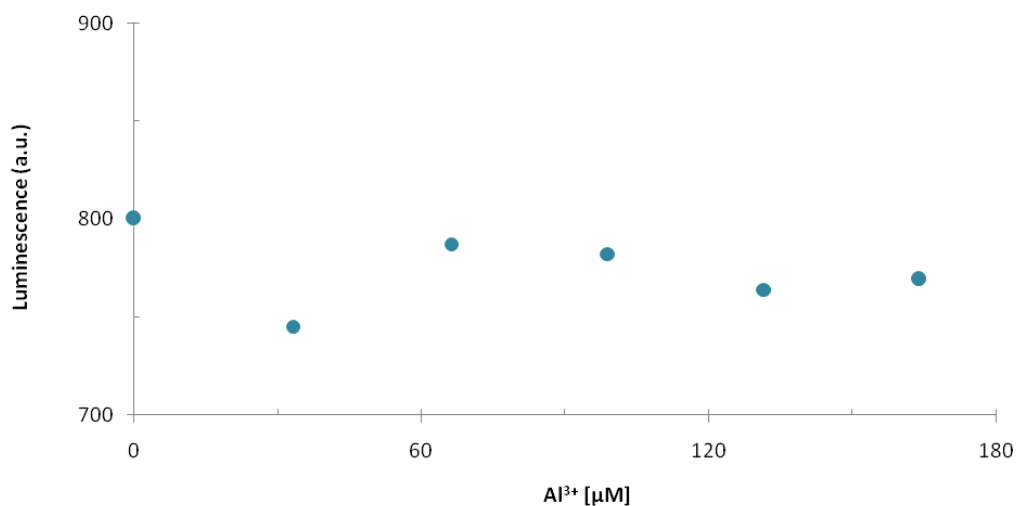


Figura 23. Atenuación originada por Al^{3+} sobre la intensidad de luminiscencia de Cdots 1 a pH 7,4 con tampón fosfato 20 mM tras adición de Al^{3+} .

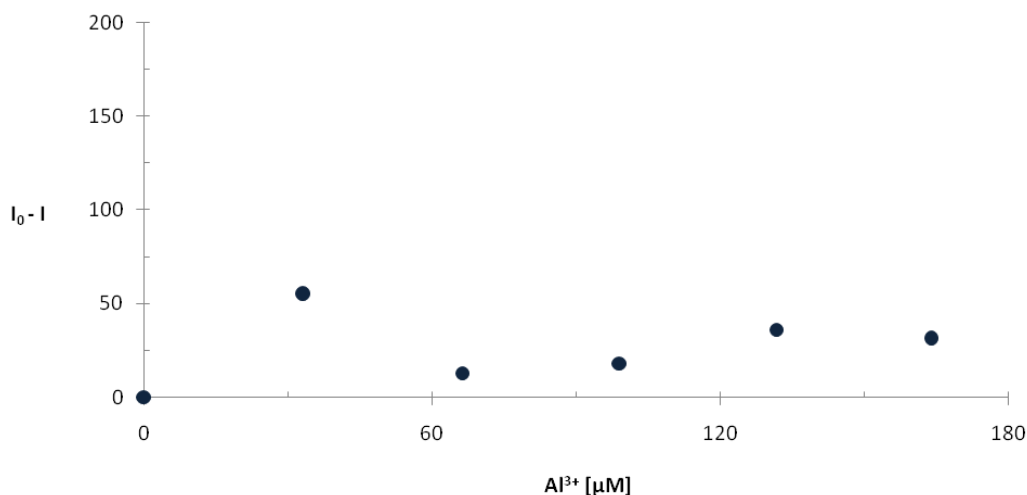


Figura 24. Reducción de la la intensidad de la luminiscencia ($I_0 - I$) de la disolución de Cdots 1 solos tamponada a pH 7,4 con tampón fosfato 20 mM y de la misma muestra tras añadir concentraciones crecientes de Al^{3+} .

En las muestras tamponadas a pH 7,5 con Tris-HCl se pudo observar que la atenuación resultó significativa a concentraciones de Al^{3+} superiores a 120 μM . Al contrario, cuando la disolución fue tamponada a pH 7,4 con tampón fosfato 20 mM apenas hubo atenuación de la luminiscencia de los Cdots, incluso a la concentración máxima de Al^{3+} ensayada. Tal como ocurrió en los ensayos con Cu^{2+} y Zn^{2+} , el Tris-HCl fue mejor solución amortiguadora con respecto al tampón fosfato.

5.5.5. Influencia de la concentración de Hg^{2+}

La disolución de Cdots ($2,8 \times 10^{-3}$ mg mL⁻¹) fue preparada como se ha descrito antes. A esa disolución se añadieron diferentes alícuotas de la solución patrón de Hg^{2+} 5 mM, de manera que las concentraciones de Hg^{2+} en la muestra fueran 0, 17, 33, 50, 66 y 82 μM , respectivamente. A continuación, la intensidad de la luminiscencia de las disoluciones se determinó después de 5 minutos de reposo. En los experimentos donde el Hg^{2+} fue usado como ion metálico para ensayar su capacidad de atenuar la luminiscencia de los Cdots, fueron observados resultados muy distintos con respecto a la solución amortiguadora usada. Es decir, cuando las disoluciones de Cdots fueron tamponadas a pH 7,5 con Tris-HCl, el ajuste lineal de los datos experimentales no fue suficientemente fiable para considerar reproducible el experimento (Figuras 25 y 26).

Además, la atenuación se produjo sólo a partir de una concentración de Hg^{2+} $50 \mu\text{M}$, con una diferencia de luminiscencia que no fue significativa incluso a la concentración máxima ensayada.

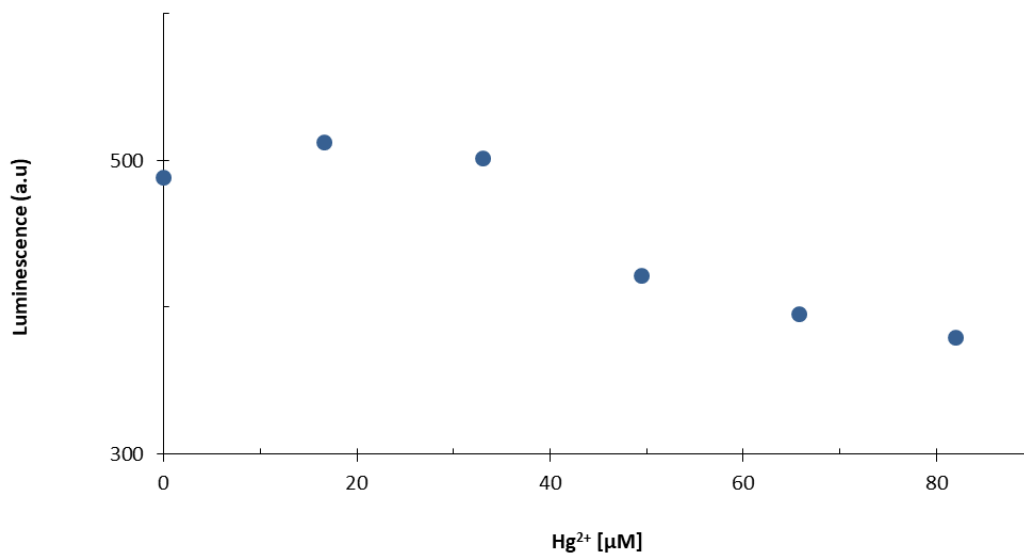


Figura 25. Atenuación originada por Hg^{2+} sobre la intensidad de luminiscencia de Cdots 1 a pH 7,5 con tampón Tris-HCl mM tras adición de Hg^{2+} .

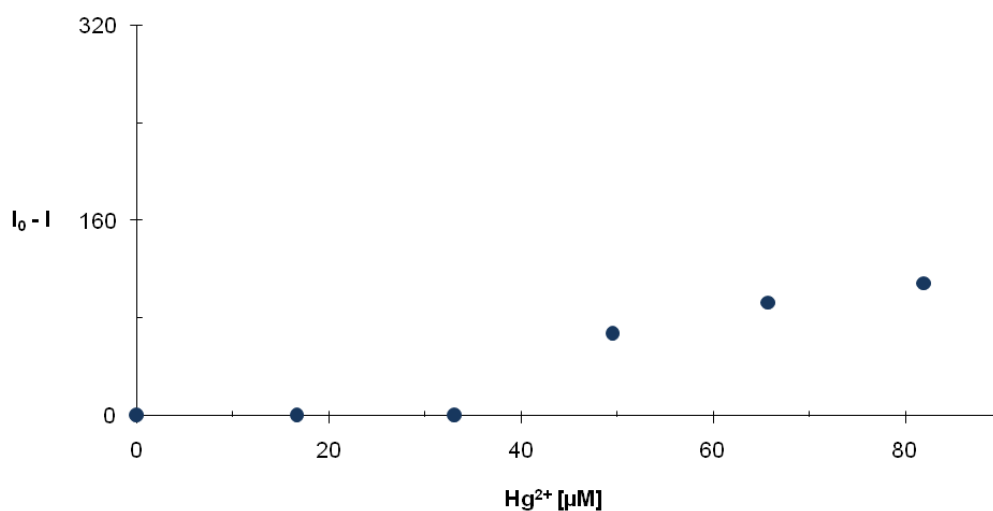


Figura 26. Reducción de la la intensidad de la luminiscencia ($I_0 - I$) inicial I_0 de la disolución de Cdots 1 solos tamponada a pH 7,5 con Tris-HCl y la luminiscencia I de la muestra tras la adición de concentraciones crecientes de Hg^{2+} .

Mientras, en las disoluciones tamponadas a pH 7,4 con tampón fosfato 20 mM el ajuste lineal de los datos experimentales fue suficientemente fiable para comprobar la reproducibilidad del experimento (Figuras 27 y 28).

La atenuación de la luminiscencia se consideró significativa, ocurriendo tras la adición de tan sólo 17 μM de Hg^{2+} . Además, fue observada una diferencia de más de 300 a.u. con respecto a la luminiscencia inicial de los Cdots solos. Más importante aún, la concentración óptima de mercurio fue establecida en 50 μM . Esa concentración fue la más baja dónde los valores de las medidas de la intensidad de luminiscencia fueron aproximadamente la mitad con respecto a la disolución de Cdots solos.

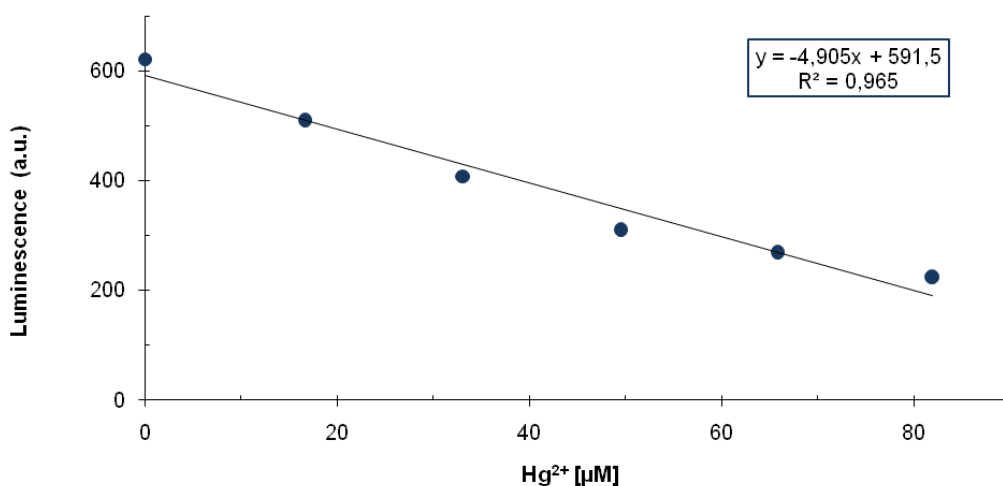


Figura 27. Atenuación originada por Hg^{2+} sobre la intensidad de luminiscencia de Cdots 1 a pH 7,4 con tampón fosfato 20 mM tras adición de Hg^{2+} . En el inserto se muestran la ecuación de calibrado y el coeficiente de correlación R^2 .

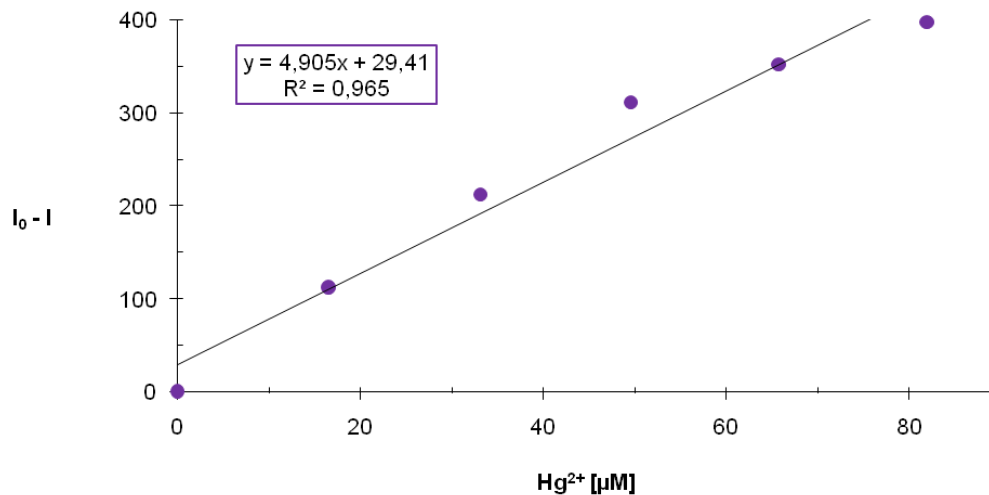


Figura 28. Reducción de la la intensidad de la luminiscencia ($I_0 - I$) inicial I_0 de la disolución de Cdots 1 solos tamponada a pH 7,4 con tampón fosfato 20 mM y la luminiscencia I de la muestra tras adición de concentraciones crecientes de Hg^{2+} . En el inserto se muestran la ecuación de calibrado y el coeficiente de correlación R^2 .

Los resultados obtenidos fueron valorados aún más tras la comparación con los de los otros iones metálicos ensayados. Efectivamente, el Fe^{3+} no logró producir una atenuación significativa de los Cdots; en las muestras tamponadas con Tris-HCl pH 7,5 una atenuación significativa fue observada a partir de una concentración de Cu^{2+} o Zn^{2+} por encima de 90 μM ; mientras, fue necesaria una concentración de Al^{3+} más alta (120 μM) para lograr una atenuación significativa de la luminiscencia de los Cdots. La buena reproducibilidad, junto con la atenuación significativa de la luminiscencia y la optimización de su concentración, más baja con respecto a los otros iones metálicos ensayados, determinaron la decisión de escoger el ion Hg^{2+} para ser usado en los sistemas de detección de biotioles basados en Cdots luminiscentes y por lo tanto el uso de tampón fosfato 20 mM a pH 7,4 como disolución amortiguadora.

6. Caracterización analítica

A continuación, se describe el estudio de los parámetros analíticos de los sistemas de detección de biotioles basados en Cdots tras la optimización.

6.1. Efecto de la concentración del ion Hg^{2+} sobre la luminiscencia de los Cdots

Para poder describir los efectos del ion Hg^{2+} sobre la luminiscencia de los Cdots, fue realizada una curva de calibrado de disoluciones tamponadas a pH 7,4 con tampón fosfato de los Cdots 1 (resultados no mostrados) y de los Cdots 2 a concentraciones crecientes de Hg^{2+} , hasta llegar a una concentración de Hg^{2+} 120 μM en las muestras. El experimento fue realizado como descrito en el subapartado 5.5.5, dejando espacio en este apartado para la discusión de los resultados obtenidos. Como se pudo observar, la adición de Hg^{2+} a la muestra produjo una atenuación de la luminiscencia de los Cdots que presentó un rango lineal significativo hasta llegar a una concentración 58 μM del ion metálico (Figura 29).

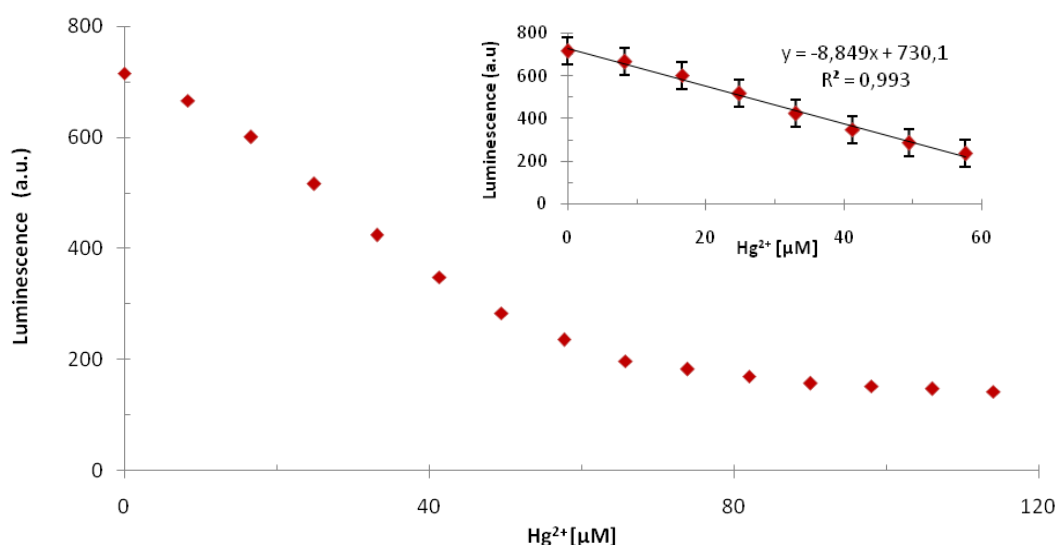


Figura 29. Curva de calibrado de la atenuación de la intensidad de luminiscencia de los Cdots 2 a concentraciones crecientes de Hg^{2+} . En el inserto se muestran la función de calibrado en el rango lineal hasta 58 μM y el coeficiente de correlación R^2 .

Ese fenómeno de atenuación o *quenching* de luminiscencia ocurrió por un proceso de transferencia de carga entre los iones mercurio y los Cdots, conforme con casos parecidos reportados en la literatura [52, 80].

6.2. *Sistemas en disolución basados en Cdots y Hg²⁺ para la detección fosforimétrica de biotioles*

Actualmente son muy pocas las aplicaciones de la fosforimetría en sensores basados en Cdots, a pesar de las ventajas proporcionadas, como son una síntesis sencilla, baja emisión de fondo y mejoras en la selectividad de la detección por el retraso que permite en el tiempo de medida con respecto a la excitación. Además, son pocos los compuestos que fosforescen en comparación con los que tienen fluorescencia o absorben la radiación [112]. Entonces, hay más interés para publicación e incluso patentabilidad de los sensores fosforimétricos basados en Cdots. Los biotioles juegan un papel importante en una gran cantidad de procesos biológicos. Pueden ser considerados como biomarcadores de varias enfermedades, tales como el Alzheimer o algunos tipos de cáncer [26, 28, 29, 94]. Por lo tanto, resulta importante el desarrollo de métodos sensibles, selectivos y rápidos para la determinación de compuestos tales como Cys, Hcy y GSH en muestras biológicas [43].

Se sabe que la fosforescencia de los Cdots resulta atenuada por iones metálicos, siendo posible su determinación y la de especies que interaccionen con ellos (sistema *turn-off/turn-on*) [48, 80, 94]. En este estudio (Figura 30) se utiliza la rápida atenuación (*turn-off*) de la fosforescencia de los Cdots mediante Hg²⁺ para la determinación de los biotioles (*turn-on*).

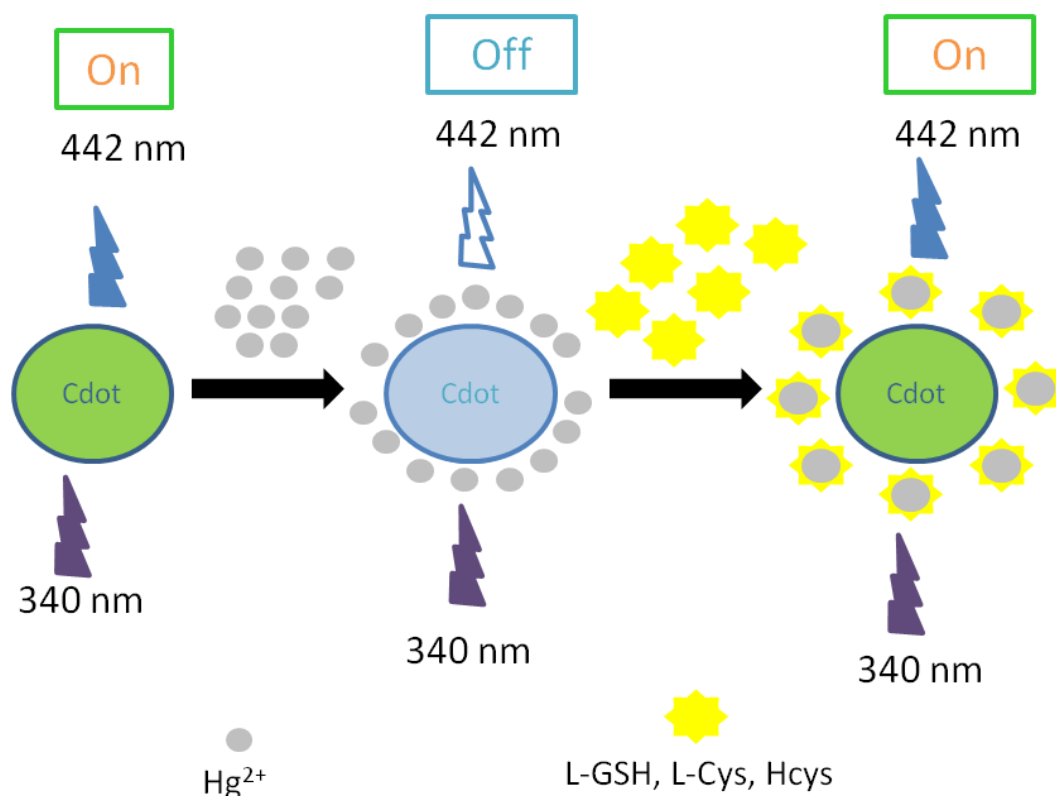


Figura 30. Sistema de detección del tipo *turn-off/turn-on*.

Como puede observarse, los Cdotes excitados a una longitud de onda de 340 nm emiten luminiscencia a una longitud de onda de 442 nm. Tras la adición de iones Hg^{2+} , ese proceso se ve atenuado por un fenómeno de transferencia de carga entre los Cdotes y el Hg^{2+} . Sin embargo, en presencia de alguno de los biotioles, tales como L-GSH, L-Cys o Hcy, ocurre una reacción que da lugar a un enlace fuerte entre tiol e ion metálico [80]. La consecuencia más importante de ese proceso es que los Cdotes recuperan su luminiscencia y así señalan la presencia de biotioles en las muestras. Han sido preparados dos sistemas de detección en disolución, conteniendo el primero Cdotes 1 (Figura 31) y el segundo Cdotes 2 (Figura 32). Ambas disoluciones han sido dejadas en incubación durante 10 minutos tras la adición de Hg^{2+} 50 μ M. Luego, fueron añadidas concentraciones crecientes de una disolución madre 5 mM de L-Cys, hasta llegar a una concentración 97 μ M de L-Cys para ambas muestras. Los experimentos fueron realizados por triplicado. La intensidad de la fosforescencia de las disoluciones se midió después de 10 minutos de reposo. El mismo protocolo fue usado para la determinación de la DL-Cys y del GSH.

En el ensayo de los Cdots 1 (Figura 31), se pudo observar una cierta diferencia entre el isómero L de la cisteína y la mezcla isomérica. En esa última el aumento de la luminiscencia no fue significativo incluso a la concentración más alta ensayada. Mientras, la adición de L-Cys produjo una subida bastante rápida de la intensidad de la luminiscencia, que llegó a ser significativa a 40 μM para luego mantenerse estable. El GSH causó una subida de la intensidad de la luminiscencia a una concentración entre 20 y 60 μM , para luego seguir subiendo de manera no significativa.

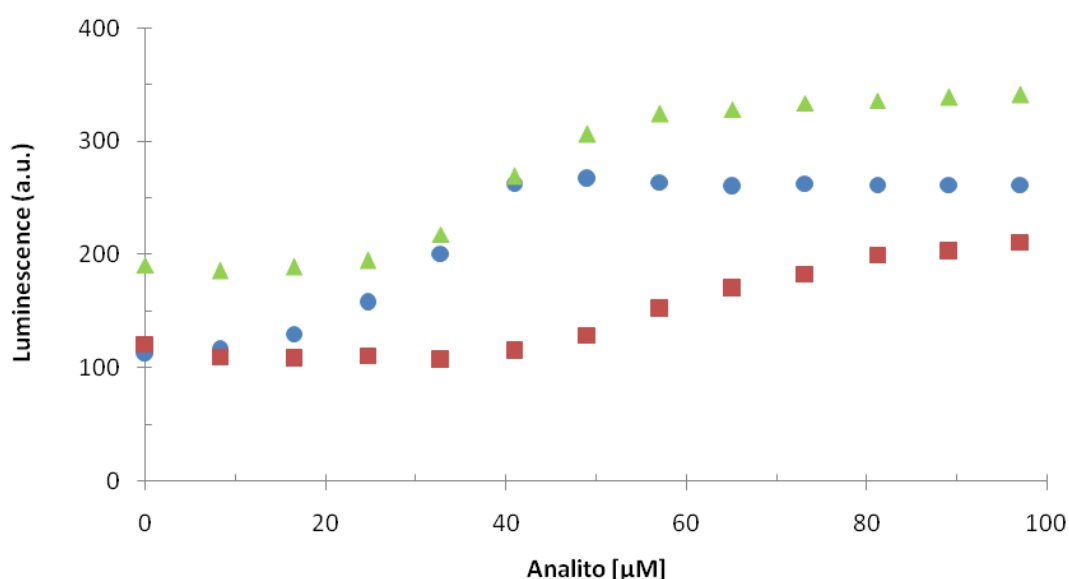


Figura 31. Aumento de la intensidad de luminiscencia del sistema de detección en disolución Cdots 1/ Hg^{2+} 50 μM tras adicionar los biotioles L-Cys (en azul), DL-Cys (en rojo) y GSH (en verde).

En el ensayo de los Cdots 2 (Figura 32), se pudo notar cómo a partir de una concentración 25 μM de DL-Cys el aumento de la intensidad de luminiscencia del sistema de detección es constante y sobre todo significativa. Mientras, L-Cys y GSH tuvieron un comportamiento muy parecido, con una subida hasta una concentración de 60 μM para luego mantenerse estable. Para los tres biotioles, a una concentración igual a la de Hg^{2+} (50 μM) la luminiscencia de los Cdots presentó una intensidad significativamente más alta con respecto a la inicial. Con respecto a los Cdots 1, los resultados obtenidos fueron mejores.

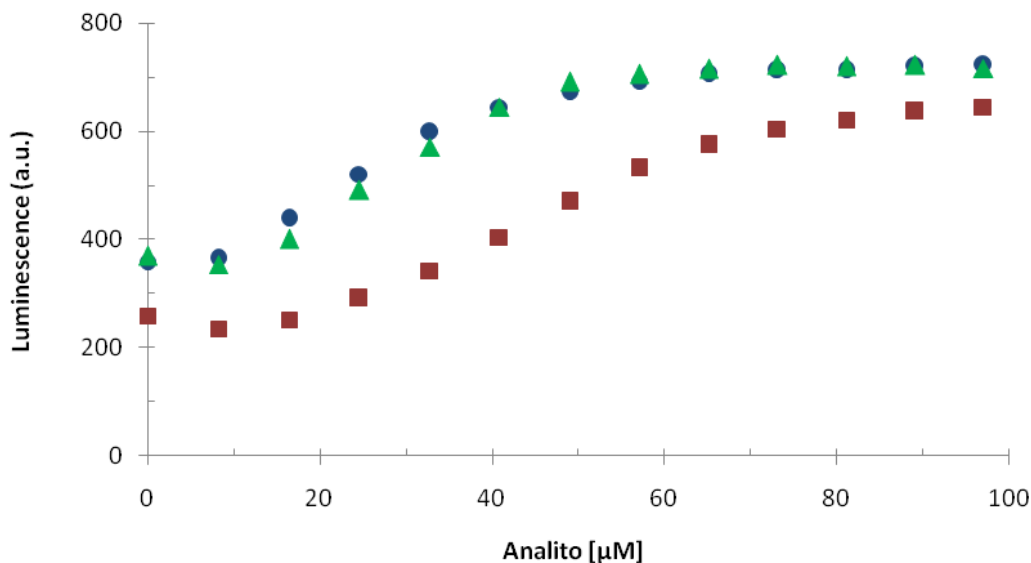


Figura 32. Aumento de la intensidad de luminiscencia del sistema de detección en disolución Cdots 2/ Hg^{2+} 50 μM tras adicionar los biotioles L-Cys (en azul), DL-Cys (en rojo) y GSH (en verde).

A continuación, se muestra la gráfica de la recuperación de la luminiscencia para las mismas muestras (Figura 33). Los tres biotioles consiguieron una recuperación significativa de la luminiscencia de los Cdots a partir de una concentración 25 μM , bastante inferior a la de Hg^{2+} presente en las muestras (50 μM). El comportamiento de los biotioles a concentraciones mayores de 50 μM fue diferente: mientras la intensidad de luminiscencia en presencia de la mezcla isomérica de la cisteína siguió subiendo, el isómero L y el GSH no produjeron ulteriores subidas de la intensidad de la luminiscencia, quedándose estable. Resulta curioso que la L-Cys tenga un comportamiento más parecido al GSH que a su mezcla isomérica.

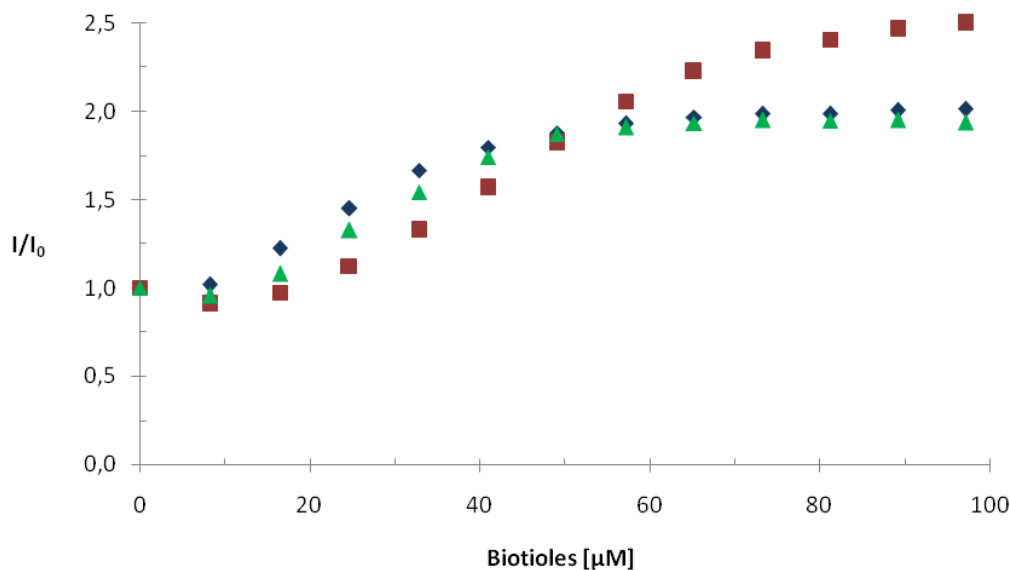


Figura 33. Recuperación de la luminiscencia I/I_0 del sistema de detección en disolución Cdots 2/ Hg^{2+} 50 μM a concentraciones crecientes de los biotioles L-Cys (en azul), DL-Cys (en rojo) y GSH (en verde). Tiempo de reacción: 50 minutos.

6.3. Estudio de la selectividad de los sistemas en disolución basados en Cdots y Hg^{2+} para la detección fosforimétrica de biotioles

Antes de estudiar la selectividad del sistema sensor Cdots/ Hg^{2+} , es decir los efectos de algunos posibles interferentes de los analitos (biotioles) frente a los mismos fueron preparadas las disoluciones de los Cdots 1 y 2, respectivamente. Luego, a las alícuotas de las muestras fue añadido Hg^{2+} 50 μM (30 μL). A continuación, las muestras fueron dejadas en incubación durante 30 minutos. Entonces, primero fueron medidos los blancos, luego fue añadida a las muestras una concentración 50 μM (30 μL) de los analitos L-Cys y L-Glutation (L-GSH) y de algunos posibles interferentes: los aminoácidos L-Glutamina (L-Gln), L-Arginina (L-Arg), L-Asparagina (L-Asn), L-Lisina (L-Lys), L-Serina (L-Ser), L-Histidina (L-His). El tiempo de incubación fue de 30 minutos. Las medidas fueron realizadas por duplicado según las condiciones establecidas (Figuras 34 y 35).

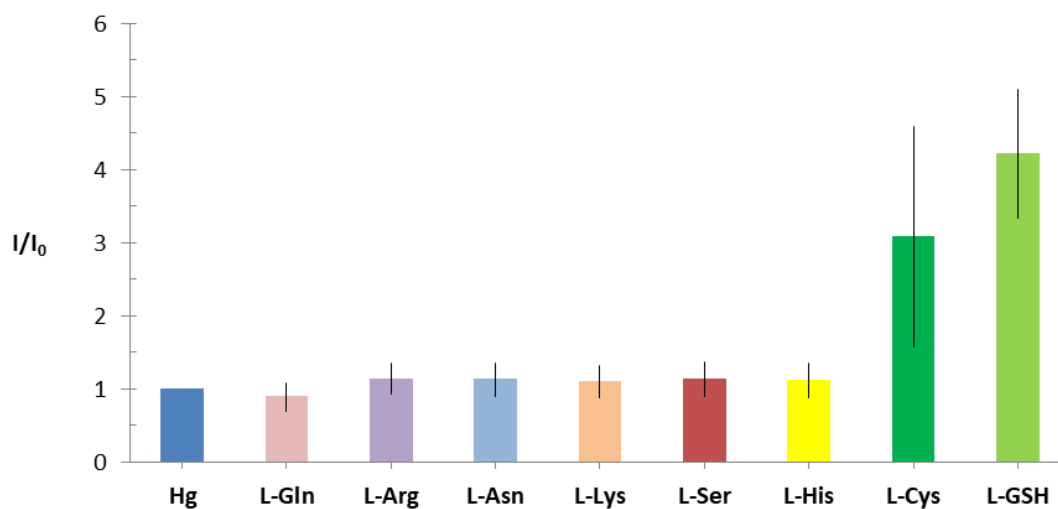


Figura 34. Recuperación de la fosforescencia con respecto al sistema de detección en disolución Cd dots 1/ Hg^{2+} 50 μM de los analitos (L-Cys y L-GSH) y de los posibles interferentes (L-Gln, L-Arg, L-Asn, L-Lys, L-Ser, L-His), todos ellos a una concentración 50 μM .

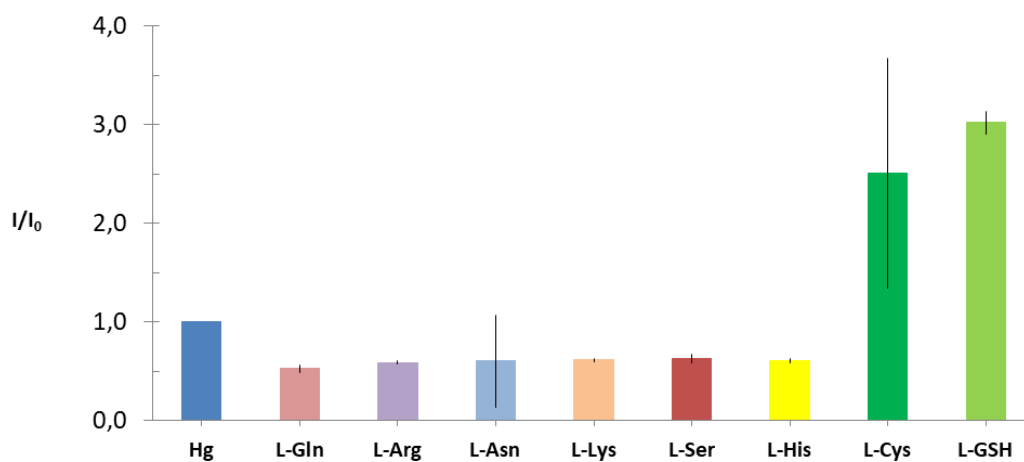


Figura 35. Recuperación de la fosforescencia con respecto al sistema de detección en disolución Cd dots 2/ Hg^{2+} 50 μM de los analitos (L-Cys y L-GSH) y de los posibles interferentes (L-Gln, L-Arg, L-Asn, L-Lys, L-Ser, L-His), todos ellos a una concentración 50 μM .

En ambas gráficas se observó que la recuperación de la fosforescencia ocurrió sólo en presencia de los analitos, además de forma significativa.

Por lo tanto, se pudo afirmar que ambos sistemas sensores presentaron selectividad tanto para L-Cys que para el L-GSH. La adición de compuestos parecidos a los analitos y que habrían podido ser considerados posibles interferentes no produjo en absoluto un aumento significativo de la intensidad inicial de la luminiscencia con respecto a los sistemas de detección en disolución de Cdots/ Hg^{2+} 50 μM . Efectivamente, sólo los aminoácidos con grupos tiol (Cys y GSH) dieron una señal de luminiscencia mejorada, mientras que casi no hubo cambios observables al agregar otros aminoácidos sin grupos tiol a una concentración idéntica. Este resultado confirmó que la restauración de la luminiscencia fue causada por la fuerte interacción entre grupos tiol y Hg^{2+} , de manera análoga a casos parecidos descritos en la literatura [48, 80]. En el sistema sensor Cdots 2/ Hg^{2+} los valores medidos para todos los interferentes ensayados fueron incluso inferiores al I_0 del sistema de detección. Esas dos evidencias demostraron que el ion Hg^{2+} entre todos los compuestos ensayados presentó una afinidad significativa sólo para los biotioles. Comparando los dos sistemas de detección, mientras el sistema Cdots 2/ Hg^{2+} presentó una luminiscencia más intensa que la medida tras adicionar cada uno de los posibles interferentes de los biotioles, en el sistema Cdots 1/ Hg^{2+} eso ocurrió sólo para la L-Gln. Además, la desviación estándar de las medidas pertinentes a ese sistema de detección resultó generalmente más alta con respecto a las medidas experimentales realizadas para el sistema de detección Cdots 2/ Hg^{2+} . Eso fue un índice de la mejor reproducibilidad del experimento llevado a cabo con el sistema de detección Cdots 2/ Hg^{2+} . En los experimentos llevados a cabo con los Cdots sintetizados con anterioridad se pudo notar una mayor diferencia en el comportamiento evidenciado en presencia de los analitos, eso se pudo explicar por la presencia de hidróxido de magnesio como precursor utilizado en la síntesis de los Cdots 2. Ese compuesto funcionó como agente quelante del otro precursor: el AC [52], impidiendo la carbonización de los grupos carboxílicos del ácido, el hidróxido de magnesio permitió obtener Cdots con propiedades luminiscentes mejoradas, una de ellas la capacidad de transferencia de carga con los iones metálicos. Por esa razón, si bien los Cdots 2 normalmente presentaron una intensidad de luminiscencia más alta con respecto a los Cdots 1, también presentaron una mejor capacidad de interactuar con el ion Hg^{2+} por lo tanto la recuperación de su luminiscencia tras la adición de cualquiera de los analitos resultó inferior a la que presentaron los Cdots 1.

Capítulo III

El experimento de recuperación de la fosforescencia de los sistemas de detección en presencia de los posibles interferentes L-Gln y L-Arg fue realizado por triplicado y según el protocolo establecido (Figuras 36 y 37). El tiempo de incubación de las muestras tras la adición de Hg^{2+} fue de 150 minutos, mientras las muestras fueron dejadas en incubación durante 30 minutos tras la adición de los aminoácidos L-Gln y L-Arg.

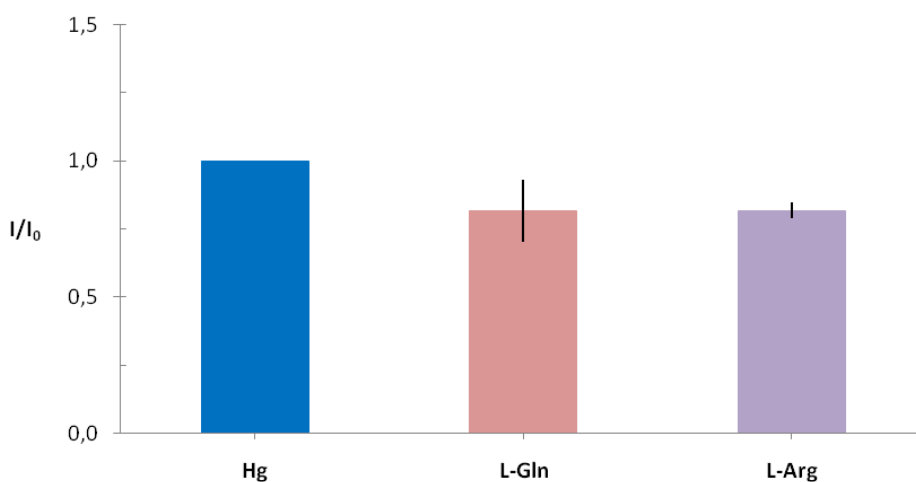


Figura 36. Recuperación de la luminiscencia con respecto al sistema de detección en disolución Cdots 1/ Hg 50 μM de los posibles interferentes L-Gln y L-Arg a una concentración 50 μM .

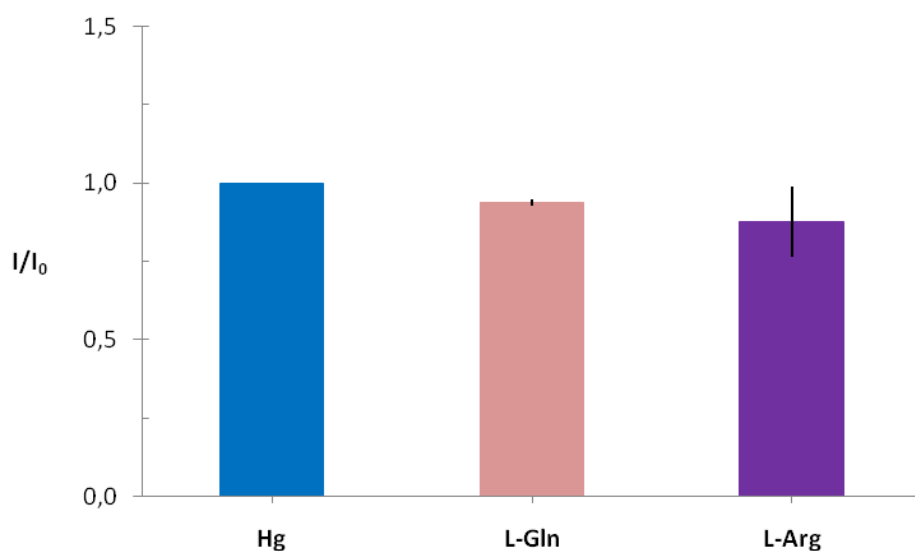


Figura 37. Recuperación de la luminiscencia con respecto al sistema de detección en disolución Cdots 2/ Hg 50 μM de los posibles interferentes L-Gln y L-Arg a una concentración 50 μM .

Para ambos sistemas de detección, lo primero que se pudo observar es que la adición de ambos compuestos produjo un ligero descenso de la intensidad de luminiscencia con respecto a las condiciones de partida. Eso significó que tanto la L-Gln como la L-Arg no consiguieron originar una interacción fuerte con el Hg^{2+} , por lo tanto, el ion metálico siguió teniendo una mayor afinidad para los Cdots, cuya luminiscencia se vio atenuada por la interacción con el catión divalente Hg^{2+} . Además, la desviación estándar fue menor en este experimento realizado por triplicado con respecto al mismo parámetro estadístico calculado para las medidas experimentales realizadas por duplicado (ver Figuras 34 y 35). Por ese motivo, los resultados obtenidos en esos experimentos se pudieron considerar más fiables con respecto a los resultados obtenidos en los experimentos de selectividad llevados a cabo previamente.

También los experimentos para validar la recuperación de la fosforescencia de otros dos posibles interferentes, los aminoácidos L-Asn y L-Lys, fueron realizados por triplicado y según el protocolo establecido (Figuras 38 y 39).

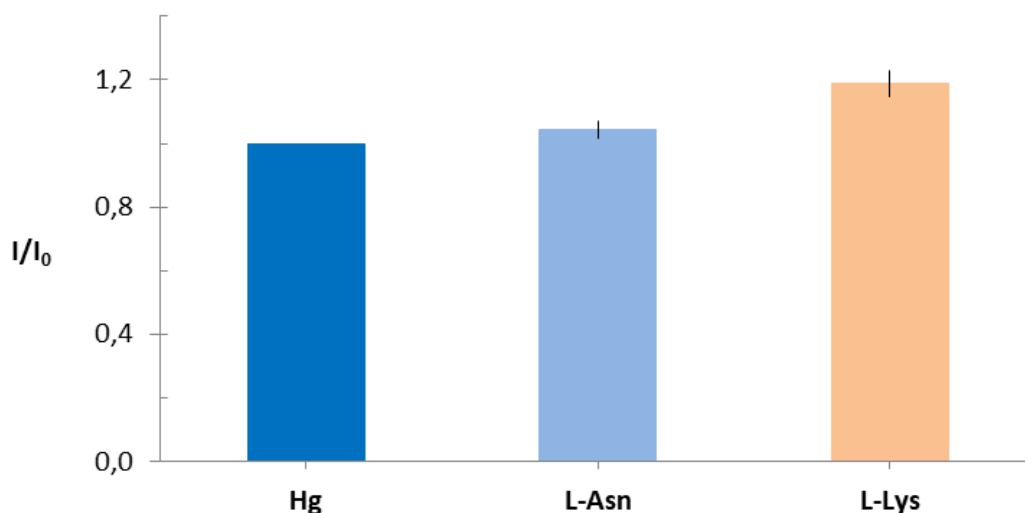


Figura 38. Recuperación de la luminiscencia con respecto al sistema de detección en disolución Cdots 1/ Hg 50 μM de los posibles interferentes L-Asn y L-Lys a una concentración 50 μM .

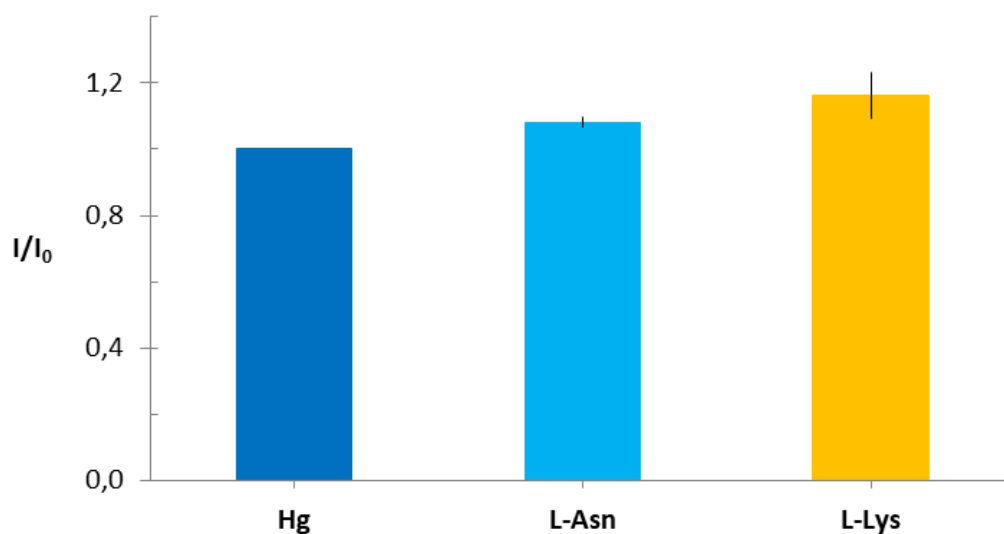


Figura 39. Recuperación de la luminiscencia con respecto al sistema de detección en disolución Cdots 2/ Hg 50 μ M de los posibles interferentes L-Asn y L-Lys a una concentración 50 μ M.

Al contrario que la L-Gln y la L-Arg, la L-Asn y la L-Lys produjeron un aumento de la intensidad de la luminiscencia con respecto al sistema Cdots/ Hg²⁺ en disolución, aunque ese incremento no fue significativo. La desviación estándar de las medidas realizadas por triplicado resultó muy baja, conforme a una mejor fiabilidad de las medidas realizadas por los sistemas de detección que entonces presentaron buena reproducibilidad. Las diferencias entre los dos sistemas de detección fueron mínimas, no significativas.

6.4 Determinación del analito L-Cys mediante los sistemas en disolución basados en Cdots

Fue obtenida la función de calibrado del sistema en disolución Cdots/ Hg²⁺ para la detección de L-Cys, mediante un experimento realizado por triplicado (Figura 40).

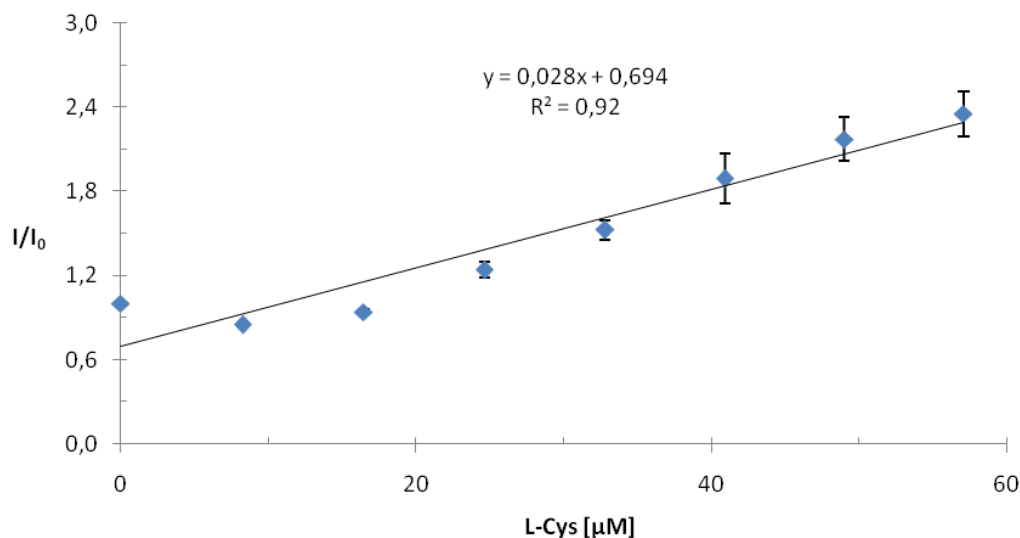


Figura 40. Recuperación de la luminiscencia I/I_0 del sistema en disolución Cdots 2/ Hg^{2+} 50 μM tras la adición de concentraciones crecientes de L-Cys. El tiempo de incubación fue de 10 minutos.

Se pudo observar una recuperación de la luminiscencia de los Cdots a partir de una concentración 24 μM del analito, que se pudo considerar significativa a partir de una concentración 40 μM . Esos datos estuvieron conformes al tiempo de reacción y además dejaron retratada la mayor afinidad entre la L-Cys y el ion Hg^{2+} con respecto a los Cdots. Incluso la reacción que dio lugar a un enlace fuerte entre tiol y metal ocurrió a concentraciones de L-Cys significativamente inferiores a las de Hg^{2+} . Por último, pero no menos importante, se pudo afirmar que ese sistema de detección presentó buenas características analíticas, tales como sensibilidad y reproducibilidad.

6.4.1. Ensayos de selectividad del sistema en disolución basado en Cdots en la detección del analito L-Cys en presencia de posibles interferentes

Para evaluar la especificidad del sistema basado en Cdots y Hg^{2+} para la detección de L-Cys, se llevaron a cabo ensayos en presencia de otros aminoácidos. El experimento de recuperación de la fosforescencia de los interferentes L-Ser, L-His y L-Lys fue realizado por triplicado y según el protocolo establecido (Figuras 41-46). Luego, fue añadida L-Cys 50 μM a las muestras. El tiempo de incubación fue de 10 minutos.

Los resultados obtenidos confirmaron que la presencia de otros aminoácidos no mostró una interferencia evidente en la luminiscencia de los sistemas de detección Cdots/ Hg^{2+} , es decir, sólo la adición de L-Cys con su grupo tiol pudo dar como resultado la mejora de la luminiscencia. Se sabe que la recuperación de la luminiscencia ocurrió tras formación de un enlace covalente Hg-SR, como fue el caso de la L-Cys. Por lo tanto, la influencia de otros aminoácidos sin grupos tiol fue limitada. En consecuencia, el sistema Cdots/ Hg^{2+} fue considerado adecuado para la detección de L-Cys en presencia de otros aminoácidos, de acuerdo con otros ejemplos reportados en la literatura [13].

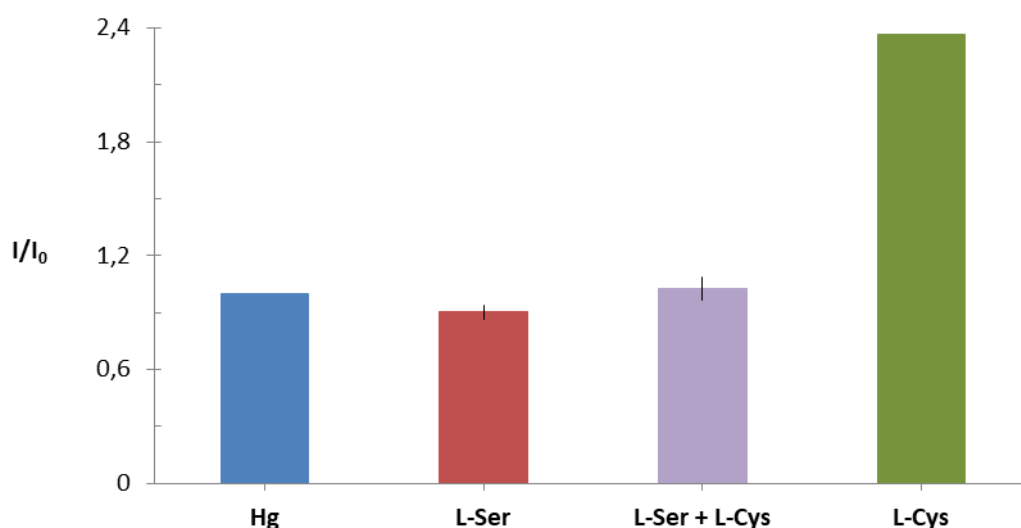


Figura 41. Recuperación promedio de la fosforescencia con respecto al sistema en disolución Cdots 1/ Hg^{2+} 50 μM (en azul) tras adición de L-Ser 50 μM (en rojo) y después de añadir a la muestra el analito L-Cys (en violeta), comparada con la muestra Cdots 1/ Hg^{2+} / L-Cys 50 μM (en verde).

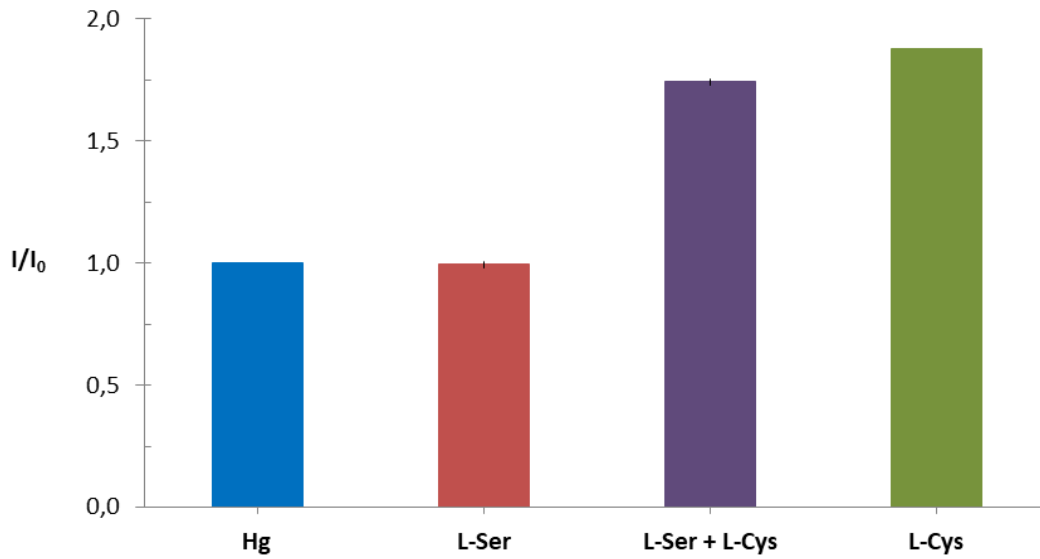


Figura 42. Recuperación promedio de la fosforescencia con respecto al sistema en disolución Cdots 2/ Hg^{2+} 50 μM (en azul) tras adición de L-Ser 50 μM (en rojo) y después de añadir a la muestra el analito L-Cys 50 μM (en violeta), comparada con la muestra Cdots 2/ Hg^{2+} / L-Cys 50 μM (en verde).

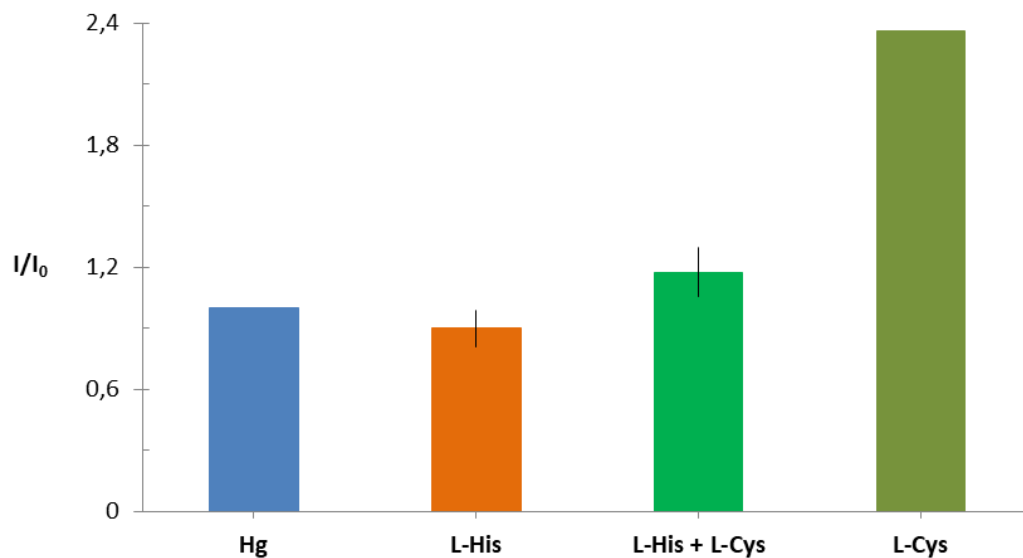


Figura 43. Recuperación promedio de la fosforescencia con respecto al sistema en disolución Cdots 1/ Hg^{2+} 50 μM (en azul) tras adición de L-His 50 μM (en anaranjado) y después de añadir a la muestra el analito L-Cys 50 μM (en verde), comparada a la muestra Cdots 1/ Hg^{2+} / L-Cys 50 μM (en verde oliva).

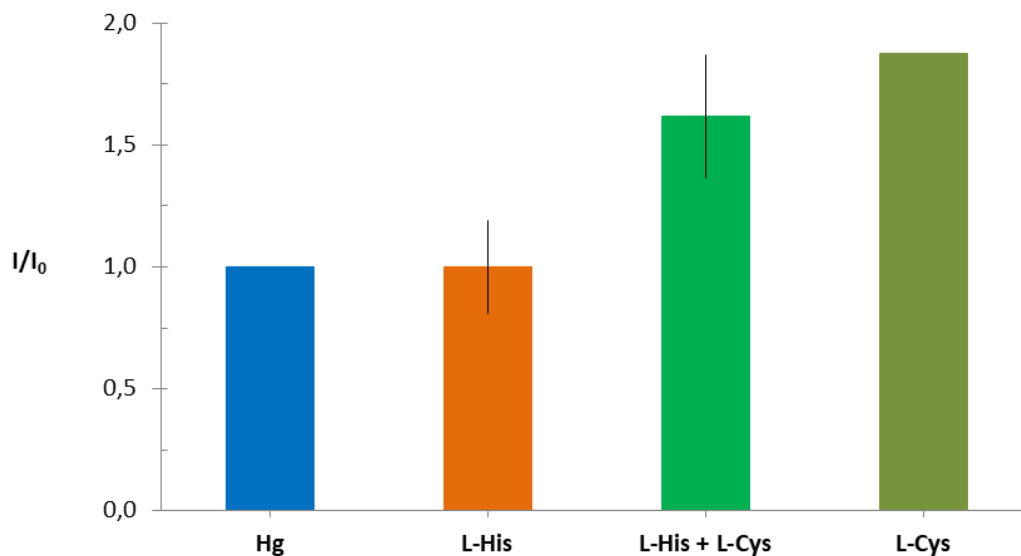


Figura 44. Recuperación promedio de la fosforescencia con respecto al sistema en disolución Cdots 2/ Hg^{2+} 50 μM (en azul) tras adición de L-His 50 μM (en anaranjado) y después de añadir a la muestra el analito L-Cys (en verde), comparada a la muestra Cdots 2/ Hg^{2+} / L-Cys 50 μM (en verde oliva).

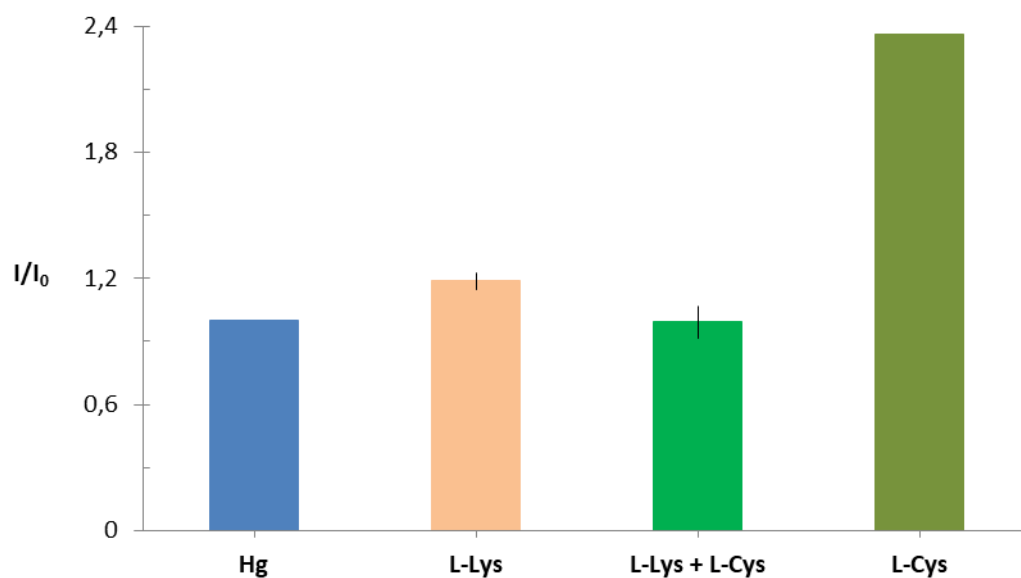


Figura 45. Recuperación promedio de la fosforescencia con respecto al sistema en disolución Cdots 1/ Hg^{2+} 50 μM (en azul) tras adición de L-Lys 50 μM (en anaranjado claro) y después de añadir a la muestra el analito L-Cys (en verde), comparada a la muestra Cdots 1/ Hg^{2+} / L-Cys 50 μM (en verde oliva).

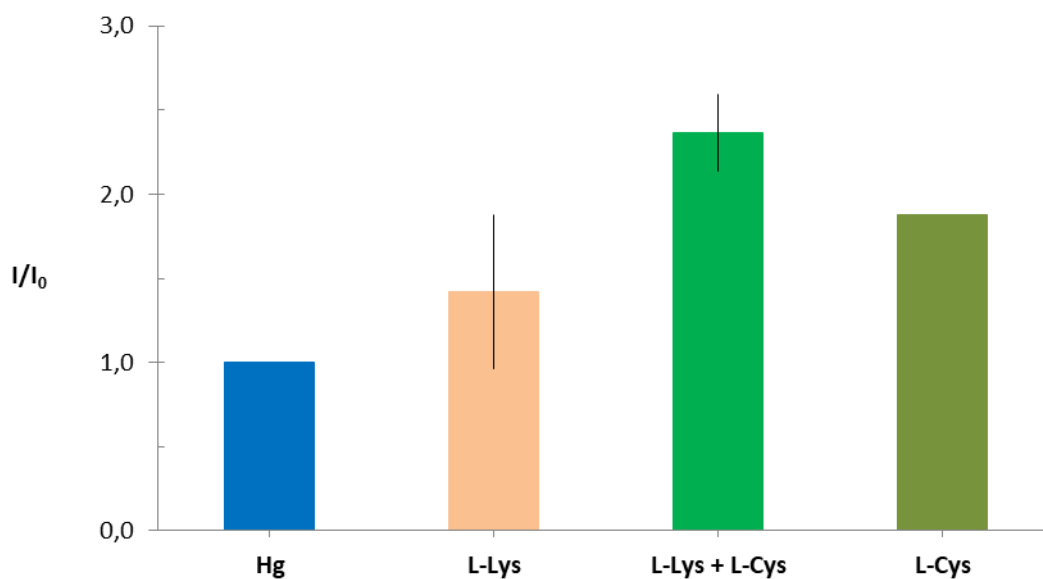


Figura 46. Recuperación promedio de la fosforescencia con respecto al sistema en disolución Cdots 2/ Hg^{2+} 50 μM (en azul) tras adición de L-Lys 50 μM (en anaranjado claro) y después de añadir a la muestra el analito L-Cys (en verde), comparada a la muestra Cdots 2/ Hg^{2+} / L-Cys 50 μM (en verde oliva).

Tanto la adición de L-Ser como de L-His al sistema en disolución Cdots 1/ Hg^{2+} no produjo un aumento de la intensidad de la luminiscencia, incluso en presencia del analito L-Cys. Mientras, en el sistema Cdots 2/ Hg^{2+} , tanto la L-Ser como la L-His en ausencia del analito no dieron lugar a una recuperación de la fosforescencia, pero lo hicieron en presencia del analito, logrando valores parecidos a las muestras a las que fue añadido sólo el analito. En conclusión, L-Ser y L-His no interfirieron con el analito, que pudo así interactuar con el ion Hg^{2+} permitiendo que los Cdots pudieran recuperar su luminiscencia.

La adición de L-Lys al contrario afectó de otra manera a los sistemas en disolución. En el sistema basado en los Cdots 1 ocurrió un aumento no significativo de la luminiscencia tras la adición de L-Lys, una intensidad que sin embargo incluso disminuyó en presencia del analito y del posible interferente y que era 2,4 veces inferior a la intensidad del sistema de detección tras haber añadido el analito solo. En el sistema Cdots 2/ Hg^{2+} la adición de L-Lys produjo un aumento de la luminiscencia, cuya intensidad presentó un incremento significativo añadiendo también el analito L-Cys, con valores significativamente no muy superiores con respecto al sistema al que fue

adicionado el analito solo. Por lo tanto, tampoco la L-Lys pudo ser considerada un interferente del analito L-Cys.

6.5. Detección del analito L-GSH mediante los sistemas en disolución basados en Cdots

Para obtener la función de calibrado del sistema Cdots/Hg²⁺ para la detección del GSH, fueron realizados ensayos por triplicado, según el protocolo establecido (Figura 47).

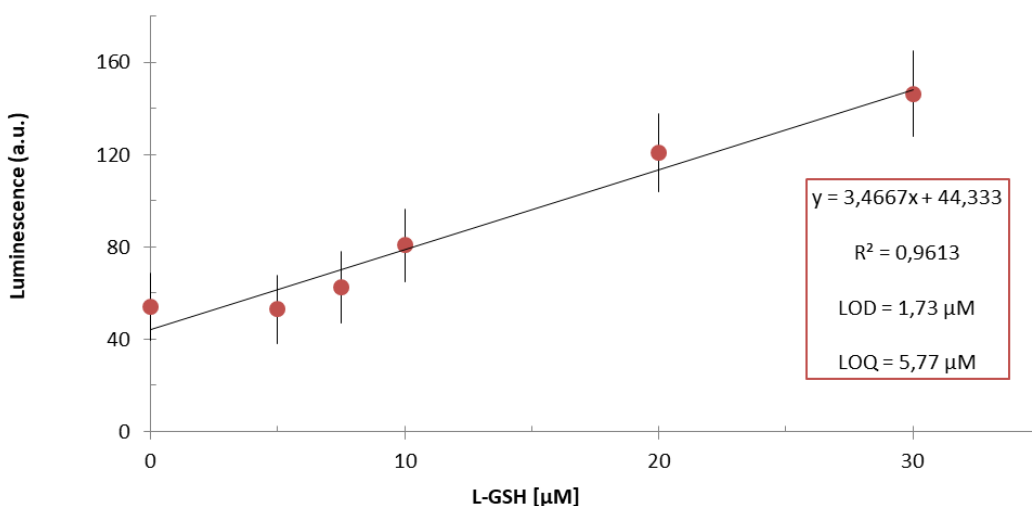


Figura 47. Curva de calibrado del sistema en disolución Cdots 2/ Hg²⁺ 50 µM a concentraciones crecientes de L-GSH hasta 30 µM. En el inserto se muestra la ecuación de calibrado, el coeficiente de correlación R², el límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ). Para más detalles sobre estos parámetros analíticos, ver los subapartados 6.6 y 6.7 del presente capítulo.

En ambos casos se pudo observar un aumento significativo de la luminiscencia en presencia del analito L-GSH, cuyo LOD fue establecido en una concentración 13 µM. Por lo tanto, a partir de esa concentración la detección del L-GSH se pudo considerar significativa. El sistema demostró así ser sensible. Observando la ecuación de calibrado, se pudo constatar la reproducibilidad del ensayo.

6.5.1. *Ensayos de selectividad del sistema en disolución basado en Cdots en la detección del analito GSH en presencia de posibles interferentes*

En los ensayos de selectividad, fue añadido Hg^{2+} 50 mM a todas las muestras de la disolución de Cdots 2. Tras 45 minutos de incubación fueron medidas tres de ellas. Luego, fue adicionado el analito GSH 50 μM a todas las muestras; a continuación, fue añadido un interferente a cada muestra (aparte una, que fue tomada como control). Concretamente, los posibles interferentes ensayados fueron L-Gln, L-Arg, L-Asn, DL-Cys, Hcy, L-Glu, manosa, galactosa, D-manitol y L-Lys (Figura 48). Todos esos compuestos fueron adicionados a una concentración 50 μM en las muestras. El tiempo de incubación fue de 30 minutos.

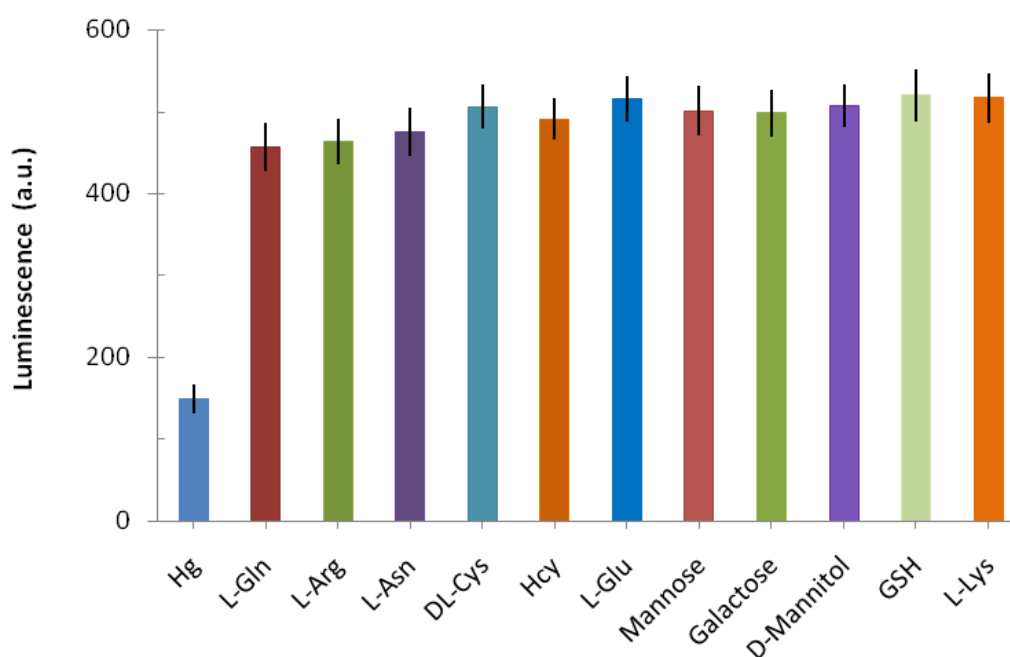


Figura 48. Intensidad de la luminiscencia con respecto al sistema en disolución Cdots 2/ Hg^{2+} / GSH (50 μM) tras adición de posibles interferentes (50 μM).

La intensidad de luminiscencia del sistema de detección tras la adición del analito solo (GSH) fue más alta con respecto a todas las muestras dónde a continuación fue adicionado también un posible interferente.

Entre los interferentes ensayados se incluyeron no sólo aminoácidos (L-Gln, L-Arg, L-Asn, DL-Cys, Hcy, L-Glu, L-Lys) sino también carbohidratos (manosa, galactosa, D-manitol). Por lo tanto, la selectividad del ensayo resultó evidente.

6.6. Límite de detección (LOD)

En Química Analítica, el LOD se define como la concentración mínima de analito distinguible de la correspondiente señal del blanco con un cierto nivel de confianza. Viene normalmente expresado como:

$$LOD = \frac{K \times S_{SEÑAL}}{b}$$

Eso es, el producto de la desviación estándar de la señal del blanco por un valor numérico elegido según el nivel de confianza K que se desee frente a la pendiente b de la curva de calibrado. En los experimentos descritos en la presente Tesis Doctoral, fue escogido un valor de 3 como nivel de confianza. Fue reportado en la literatura que el LOD de los sensores basados en Cdots para detección de biotioles y Hg^{2+} estaba dentro de un rango entre nM y mM [28, 48, 68, 70, 84, 91]. El sistema de detección basado en Cdots descrito en el presente capítulo de esta Tesis Doctoral tuvo un LOD de 73 1,7 μM para el GSH, que por cierto está dentro del rango encontrado en la literatura. Ese sistema demostró así ser sensible, aunque existían varios sensores que tuvieron un límite de detección incluso en el rango nanomolar [43, 49].

6.7. Límite de cuantificación (LOQ)

El LOQ (el acrónimo es en inglés) se establece como el límite inferior de concentraciones por debajo del cual las medidas no ofrecen un determinado nivel de confianza. Esto es, el LOQ es el primer valor de la concentración del analito que puede determinarse con precisión y exactitud en una muestra, bajo las condiciones experimentales establecidas. El LOQ se expresa en las mismas unidades de concentración empleadas para el analito de la muestra.

En este trabajo de investigación el LOQ ha sido calculado mediante la misma ecuación del LOD, utilizando un valor de $K = 10$. Concretamente, los sistemas de detección basados en Cdots descritos en este capítulo de la presente Tesis Doctoral tuvieron LOQ de $5,8 \mu\text{M}$ (GSH).

6.8. Comparación de los sistemas en disolución basados en Cdots con los sensores encontrados en la literatura para la detección de los biotioles

Se ha comparado los parámetros analíticos de los sensores fosforimétricos basados en Cdots para determinación de biotioles desarrollados en este capítulo con los de otros procedimientos analíticos encontrados en la literatura (Tablas 1 y 2).

Tabla 1. Sensores basados en Cdots para detección de biotioles.

LOD y otros datos	Rango dinámico lineal	Aplicaciones	Interferencias significativas	Tipo medida	Ref.
50 nM (GSH)	0,1-0,6 µM	Plasma humano enriquecido	Ninguna	Fluorimetría	[10]
40 nM	6,0-300 nM	Muestras de plasma y orina humanas (solas y enriquecidas)	Ninguna	Fluorimetría	[27]
50 nM	0-30 µM	Proteínas y suplementos dietéticos	Penicilamina, ureasa, albúmina de suero bovino (BSA), pepsina, glucosa oxidasa (GOx)	Colorimetría y fluorimetría	[63]
86 nM	$1,0 \times 10^{-7}$ - $1,1 \times 10^{-5}$ M	Suero humano (enriquecido con Cys)	Ninguna	Fluorimetría	[70]
2 µM (pH 3,0); 1,9 µM (pH 7,0).	0-150 µM (pH 3,0); 0-10 µM (pH 7,0).	En disolución y en citosol de células MCF-7	Cys y metionina	Fluorimetría y fotoluminiscencia	[78]
23,6 nM (L-Cys); 12,3 nM (Hcy); 16,8 nM (GSH).	1-10 µM (L-Cys); 0,2-2,5 µM (Hcy); 0,1-2,0 µM (GSH).	Suero (biotioles); células HeLa (imagen).	-	Fluorimetría	[115]
0,6 µM (fluorescencia); 2,8 µM (resonancia magnética).	1-200 µM (fluorescencia); 5-200 µM (resonancia magnética).	En disolución y ensayos citotoxicidad en células tumorales	Ninguna	Fluorimetría y resonancia magnética (MR)	[116]
57 (GSH); 72 nM (Cys).	25-500 nM (GSH)	Agua de grifo y de río (enriquecidas)	Ninguna	Fluorimetría	[117]

Tabla 1. Sensores basados en Cdots para detección de biotioles (continuación).

LOD y otros datos	Rango dinámico lineal	Aplicaciones	Interferencias significativas	Tipo medida	Ref.
0,5 μM (GSH)	0,5-80 μM	En disolución	Cys	Fluorimetría	[118]
22 nM (GSH)	0,2-600 μM	Sangre entera humana	Ninguna	Fluorimetría	[119]
15 nM	Hasta 974,1 μM	Disolución	Ninguna	Fluorimetría	[120]
0,3 μM (Cys)	2-10 μM	Plasma humano (muestras solas y enriquecidas)	Ninguna	Fluorimetría	[121]
20 nM (GSH)	0,1-60 μM (GSH)	Agua, comida y muestras biológicas (plasma ratón)	Ninguna	Fluorimetría	[122]
20 nM (GSH)	0-10 μM (GSH)	Suero diluido ratón (muestras enriquecidas)	Ninguna	Fluorimetría	[123]
1,7 μM (GSH)	13-30 μM (GSH)	En disolución	Ninguna	Fosforimetría	Este trabajo

Capítulo III

El LOD de los sensores basados en Cdots para detección de biotioles estuvo dentro de un rango entre nM y mM. De entre los sistemas de detección descritos en ese capítulo, el ensayo para determinación del GSH tuvo un LOD de 1,73 μM , por lo tanto, se encuentra dentro del rango encontrado en la literatura. El rango dinámico lineal encontrado para una detección fiable del analito GSH está en un rango micromolar, como la mayoría de los procedimientos analíticos reportados. Los sistemas sensores basados en Cdots descritos en la presente Tesis Doctoral no fueron ensayados en muestras reales. En la literatura hubo otros sensores que no tuvieron aplicaciones en muestras reales, pero otros fueron capaces de detectar a los analitos de interés: principalmente en muestras de agua, sangre, o en células durante experimentos de bioimagen. Hay que destacar que la mayoría de los sensores descritos en este apartado no presentaron interferencias significativas. Sin embargo, hubo algunos casos de interferencias significativas debidas a Cys en dispositivos analíticos para la determinación de GSH. Los ensayos descritos en este capítulo fueron de tipo fosforimétrico, mientras casi todos los sensores basados en Cdots para la determinación de biotioles fueron de tipo fluorimétrico.

También han sido comparados los parámetros analíticos de los ensayos basados en Cdots para la detección fosforimétrica de biotioles con los que fueron reportados para otros sistemas de detección de los mismos analitos (Tabla 2). Actualmente resulta menos frecuente el empleo de otras metodologías para la detección de biotioles, a pesar de tener LOD más en el rango nanomolar que en el micromolar.

Tabla 2. Otras metodologías para detección de biotioles.

LOD y otros datos	Rango dinámico lineal	Aplicaciones	Interferencias significativas	Tipo medida	Ref.
11,5 nM (Cys); 16,1 nM (Hcy); 15,5 nM (GSH). Recuperación (%): 97,1-105,3 (Cys). RSD (%): 2,2-3,8 (Cys).	0,02-20 μ M	Suero humano (muestras enriquecidas)	BSA	Absorción	[124]
6 nM	0-100 y 100-1 nM	Imagen células tumorales	Ninguna	Fluorimetría	[125]
0,1 μ M (GSH, Cys e Hcy).	0,2-30 μ M (GSH); 0,5-22 μ M (Cys); 0,5-24 μ M (Hcy).	Suero humano (muestras enriquecidas)	-	Fluorimetría	[126]
0,3 μ M (Cys)	0-7 μ M (Cys)	Imagen células vivas HEK293	Ácido sulfhídrico (H ₂ S); GSH.	Fluorimetría	[127]
50 nM (Cys)	0-10 μ M (Cys)	Imagen células vivas (levadura)	GSH; Hcy; H ₂ S.	Fluorimetría	[128]
0,8 nM (Cys). Recuperación (%): 96,3-108,2	2,0 nM-50 μ M (Cys)	Suero humano al 5% (muestras enriquecidas)	Ninguna	Fluorimetría	[129]

Por cierto, el rango dinámico lineal de esos dispositivos analíticos suele ser menor con respecto a los sistemas de detección basados en Cdots. Han sido reportadas aplicaciones prácticas en imagen de células y en muestras de suero humano. Mientras, los sensores basados en Cdots encontraron más aplicaciones y presentaron menos interferencias significativas con respecto a las otras metodologías analíticas usadas para detección de los biotioles. Los compuestos que dieron con más frecuencias interferencias significativas fueron el GSH y el H₂S, que al contrario no fueron reportados como posibles interferentes en los sensores basados en Cdots. En ambas categorías de dispositivos analíticos las medidas fueron principalmente de tipo fluorimétrico. La diferencia fue encontrada en el mecanismo que produjo la detección por fluorescencia. Esas metodologías se basan en la transferencia intramolecular de protón en el estado excitado (ESIPT) de algún fluoróforo [127, 128], mientras en los sensores basados en Cdots la detección está basada principalmente en la FRET entre fluorocromos. Por lo tanto, se puede afirmar que la creación de sistemas en disolución basados en Cdots para la detección fosforimétrica de biotioles llevada a cabo como parte integrante del trabajo de investigación descrito en la presente Tesis Doctoral cabe considerarla como de interés para la detección de esos biomarcadores.

6.9. Sistemas en disolución basados en Cdots para detección de L-Cys: ventajas e inconvenientes

Los sistemas de detección de L-Cys que han sido creados durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral se basan en la mayor afinidad entre L-Cys y el ion Hg²⁺ con respecto a los Cdots, como descrito anteriormente con más detalles (ver subapartado 6.2). Esos sistemas en disolución presentan varias ventajas. En primer lugar, los ensayos de esos sistemas de detección han mostrado buenas características analíticas, tales como sensibilidad y reproducibilidad. Los resultados obtenidos en los estudios de especificidad han confirmado que la presencia de otros aminoácidos no interfiere de manera evidente en la detección, es decir, sólo la adición de L-Cys (que tiene un grupo tiol) puede dar como resultado la mejora de la luminiscencia de los Cdots en los sistemas en disolución (ver Figuras 34, 35 y 41-46).

En consecuencia, esos sistemas basados en Cdots son adecuados para la detección de L-Cys en presencia de otros aminoácidos, de acuerdo con otros ejemplos reportados en la literatura [13]. Sin embargo, esos sistemas de detección presentan algunos inconvenientes. Por ejemplo, los sistemas de Cdots y Hg^{2+} en disolución no fueron ensayados en muestras reales. Mientras, en la literatura hay ejemplos de sensores basados en Cdots para detección de L-Cys. Otro inconveniente podría ser el uso de mercurio (metal tóxico) en el sistema de detección, aunque sea efectivo y usado en otros sensores parecidos [13, 52, 80].

6.10. Sistemas en disolución basados en Cdots para detección de GSH: ventajas e inconvenientes

En esos sistemas de detección, se puede observar un aumento significativo de la luminiscencia en presencia de GSH, cuyo LOD fue establecido en una concentración $1,73 \mu\text{M}$. Los sistemas basados en Cdots han demostrado así tener buena sensibilidad, aunque han sido reportados varios sensores con un LOD incluso en el rango nanomolar. Observando la ecuación de calibrado, se puede constatar la reproducibilidad del sistema de detección. En los estudios de selectividad, la intensidad de luminiscencia de los Cdots en las muestras en disolución tras la adición del analito solo (GSH) ha resultado más alta con respecto a todas las muestras dónde ha sido añadido también algún posible interferente. Han sido ensayados diferentes compuestos, tales como aminoácidos (L-Gln, L-Arg, L-Asn, DL-Cys, Hcy, L-Glu, L-Lys) y carbohidratos (manosa, galactosa, D-manitol). Por lo tanto, la selectividad del sistema de detección hacia el GSH resultó evidente. Tampoco este sistema ha sido ensayado en muestras reales, al contrario de otros sensores encontrados en la literatura. Por lo tanto, no se conocen las prestaciones de este sistema fosforimétrico en la detección del GSH en agua, comida y suero. Por cierto, el uso de un metal tóxico para la salud humana como el mercurio para la detección del GSH podría ser un inconveniente, de la misma manera que el sistema para detección de L-Cys desarrollado en la presente Tesis Doctoral y muchos dispositivos analíticos usados en la detección de GSH que han sido reportados en la literatura [115, 117, 122, 123].

CAPÍTULO IV

**SENSOR LUMINISCENTE BASADO
EN CARBON DOTS PARA LA
DETERMINACIÓN DE
HEMOGLOBINA Y SU
IMPLEMENTACIÓN EN UN
DISPOSITIVO PORTÁTIL**

1. Introducción

1.1. La hemoglobina: interés de su determinación

La hemoglobina (Hb) es una de las proteínas más ampliamente distribuidas en el campo biológico: está presente en los glóbulos rojos de todos los vertebrados y en el plasma de muchos invertebrados [65, 130-132]. La Hb desempeña un papel vital en el transporte del oxígeno molecular a través de la sangre desde los órganos respiratorios (pulmones o branquias) a las distintas partes del cuerpo y a su vez del dióxido de carbono hacia los pulmones [65, 133-137]. La masa total de eritrocitos de un ser humano adulto contiene unos 600 g de Hb capaces de transportar 800 mL de oxígeno. La Hb también actúa en la generación de energía y la transmisión de electrones; además puede interactuar específicamente con otros gases, tales como CO y NO [138, 139]. La Hb es una metaloproteína tetramérica (Figura 1): es decir, su molécula tiene una estructura cuaternaria compuesta de cuatro subunidades de proteínas globulares, cada una de las cuales contiene un grupo hemo no proteico [132]. Efectivamente, estos grupos hemo contienen un átomo de hierro en estado ferroso quelado a cuatro anillos de protoporfirina (Figura 2) [135, 140]. La Hb tiene un punto isoeléctrico (pI) de 6,8 y un peso molecular de aproximadamente 65 kDa [136, 137, 138]. Cada grupo hemo se localiza en una zona determinada de una de las cadenas polipeptídicas. El hemo se combina de forma reversible con el oxígeno molecular y con una molécula de dióxido de carbono. Este grupo hemo es el responsable del color rojo de la Hb. Efectivamente, la sangre tiene un color rojo claro cuando la hemoglobina está unida al oxígeno (oxihemoglobina), mientras pasa a un pigmento cereza brillante combinado con CO (carboxihemoglobina), lo que origina intoxicación. El color es chocolate en la metahemoglobinemia y verde en la sulfohemoglobinemia. La Hb es el principal componente proteico de los glóbulos rojos y resulta incluso la proteína más abundante en el suero humano [141]. Su nivel es muy importante para indicar algún problema de salud: una cantidad anormalmente alta o baja de Hb en el suero puede dar lugar a diversas enfermedades, tales como la policitemia vera, que es una enfermedad de la médula ósea que lleva a un aumento anormal de la cantidad de células sanguíneas, y la anemia, enfermedad que se define por una disminución en el número de glóbulos rojos en la sangre o en los niveles de hemoglobina respecto a los valores normales [137].

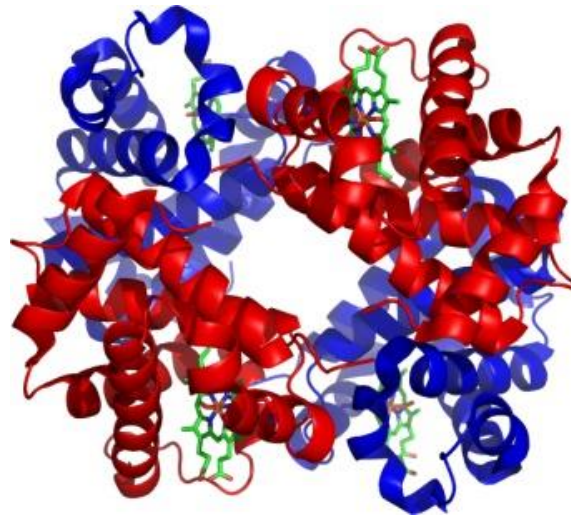


Figura 1. Estructura cuaternaria de la Hb.

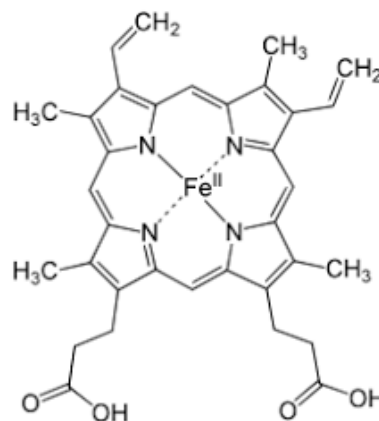


Figura 2. Estructura del grupo hemo de la Hb.

La cantidad de Hb en la sangre puede indicar también la existencia de otras patologías graves (leucemia, enfermedades cardíacas, hipertensión, *etc.*) con posible resultado de muerte; mientras que su nivel normal muestra el buen funcionamiento del organismo [65, 132-134, 138]. En general, el nivel de Hb se expresa como su cantidad en gramos/decilitro (g/dL) de sangre total y normalmente está entre 13,0-17,5 g/dL para hombres adultos; 12,0-15,3 g/dL para mujeres adultas; 14,0-24,0 g/dL para recién nacidos y 9,0-13,0 g/dL para lactantes [131]. La edad, sexo, dieta y medio ambiente, son las variantes fisiológicas más importantes que influyen en la cantidad de Hb en la sangre.

Por ejemplo, la concentración de Hb en niños es muy parecida para ambos sexos. En los varones, después de la pubertad aumenta y se mantiene así. En las mujeres sucede lo mismo, pero estos valores son menores con respecto a los hombres. La prueba de Hb fue una de las primeras realizadas en los laboratorios de patología y evolucionó en las últimas décadas. De acuerdo con las directrices de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Hb puede usarse como un biomarcador único para el diagnóstico de la anemia. La prueba de Hb también es muy importante durante el embarazo, ya que se ha asociado con un mayor riesgo de parto prematuro [142]. La determinación de la Hb en la sangre fue una parte importante de la prueba de envenenamiento en casos criminales, lo cual fue de gran importancia para la ciencia forense [139]. Hoy en día, la determinación de Hb juega un papel crucial en la identificación de enfermedades como anemia (nivel bajo de Hb) o policitemia (nivel alto de Hb) [132]. Por lo tanto, el análisis cuantitativo fácil y preciso de Hb en el diagnóstico clínico es esencial para evaluar la extensión de enfermedades y así poder intervenir para su control [132, 133]. La determinación de la concentración de Hb se utiliza en gran medida en los análisis de sangre para el diagnóstico de enfermedades como la anemia (talasemia, enfermedad de células falciformes), cardiopatías, leucemia y pérdida excesiva de sangre [131, 141]. Cabe mencionar que alrededor de dos mil millones de personas, principalmente mujeres y niños, padecen anemia en todo el mundo [65]. La liberación de Hb a la orina resulta comúnmente asociada con enfermedades renales crónicas, infecciones y malaria [135]. Además, la concentración de Hb es un indicador importante en bromatología para la evaluación de la calidad de la carne [140]. Para estos propósitos, el cooxímetro de laboratorio y los dispositivos de punto de atención (POC) se utilizan comúnmente para medir el nivel de Hb. Más recientemente, los pulsioxímetros disponibles comercialmente permiten la medida continua no invasiva de hemoglobina [131].

1.2. Métodos para determinación de Hb

Existen diversos métodos analíticos para la determinación de la Hb [139], aunque los más utilizados se fundamentan en la capacidad de la Hb o alguno de sus derivados (tales como la oxihemoglobina o la cianometahemoglobina) para absorber radiación, que puede ser medida en un espectrofotómetro.

La reacción básica en la producción de cianometahemoglobina da lugar a la conversión de la Hb en metahemoglobina por el ferrocianuro y la subsiguiente combinación de la metahemoglobina con cianuro potásico para formar cianometahemoglobina. La OMS documentó en detalle numerosos métodos disponibles para la estimación del nivel de Hb en sangre, cada uno de los cuales posee sus propias ventajas y limitaciones. La técnica de la hematina ácida de Sahli, la técnica de Hoppe-Seyler, la técnica de cianometahemoglobina de Lovibond-Drabkin, la técnica de SLS sin cianuro utilizada en la mayoría de los analizadores de hematología, se basan todas ellas en el principio colorimétrico [142]. Entre todos estos métodos, los basados en la absorción (con los reactivos de van Kampen y Zijlstra) son los más populares y se adoptan ampliamente en los laboratorios clínicos y biológicos. Sin embargo, debido al uso de un reactivo muy tóxico como es el cianuro de potasio, el proceso es complicado bajo el punto de vista de higiene y seguridad [137]. Aun así, el método de cianometahemoglobina es considerado como la técnica más precisa y ampliamente utilizada para medir la Hb [1]. Este método resulta el más recomendado por su bajo costo, la estabilidad de las soluciones de cianometahemoglobina y la posibilidad de derivar todos los tipos de Hb (con excepción de la sulfohemoglobina) a cianometahemoglobina. Otro método es el de Sahli, que se basa en la conversión de la Hb en hematina ácida. Sin embargo, los valores promedio de Hb obtenidos son en general menores con el método de Sahli que con el de la cianometahemoglobina. Además, las diferencias entre ambos métodos son estadísticamente significativas. Sin embargo, esos métodos no son adecuados para la determinación de bajas concentraciones de Hb, lo que resulta de gran importancia para el diagnóstico clínico; por ejemplo, para detectar hemólisis o describir cambios discretos en los niveles de Hb en la sangre, caso de que los haya. Por lo tanto, existe interés de un sistema de medida de Hb en sangre humana, que sea simple, razonablemente preciso y más sensible que los métodos tradicionales [65]. Los métodos de determinación reportados en la literatura incluyen principalmente cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), espectroscopia de absorción ultravioleta y análisis por fluorescencia [135, 138, 140]. Aunque estos métodos tienen una alta precisión, son costosos o requieren un tratamiento matemático complejo. Por lo tanto, estos métodos están sujetos a un cierto grado de restricciones en la aplicación práctica [139]. Debido a su importancia en los procesos bioquímicos y fisiológicos, en los últimos años han sido reportados varios métodos analíticos novedosos para la determinación sensible de Hb,

incluidos métodos fluorimétricos, electroquímicos, colorimétricos, quimioluminiscentes e inmunoensayos [65, 133-135, 137, 138, 140, 141].

Sin embargo, algunos de estos métodos para la detección sensible de Hb requieren reactivos tóxicos, equipos y materiales costosos (tales como aptámeros o anticuerpos), una preparación complicada de la sonda, el uso de colorantes fluorescentes que sufren fotodecoloración, un complicado tratamiento previo de las muestras y un límite de detección de Hb relativamente más alto [65, 130, 133, 134, 138, 141]. Durante los últimos años, la hemoglobina atrajo a la comunidad de investigación de (bio)sensores [142]. Con las nanotecnologías en rápido desarrollo, los investigadores ahora están creando sistemas de determinación con materiales de tamaño nanométrico, como nanopartículas, nanovarillas, puntos cuánticos (Qdots), nanotubos de carbono (CNT), *etc.* Estos sistemas han demostrado ser capaces de proporcionar mejores rendimientos, como una mayor sensibilidad y una mayor selectividad, límite de detección inferior, *etc.*, en comparación con los sistemas de detección convencionales. Por ejemplo, los nanoclusters de oro (AuNCs) son un tipo de nanomateriales de nuevo desarrollo. Su fluorescencia puede ser atenuada por varias especies, como mercurio, cobre, peróxido de hidrógeno (H_2O_2), azufre, *etc.*, y estas interacciones ya se han aplicado en esquemas de detección relacionados [137]. Además, la combinación de electroquimioluminiscencia (ECL) y Qdots semiconductores ha ofrecido una nueva oportunidad para la resolución final del desafío de determinación de la Hb [139]. En comparación con las técnicas mencionadas anteriormente, se realizó una investigación limitada en la detección de Hb mediante el uso de Cdots fluorescentes con espectrometría de fluorescencia. Debido a las ventajas distintivas de fácil operación, alta sensibilidad y selectividad, las sondas fluorescentes basadas en Cdots para la determinación de Hb se convierten en alternativas válidas. Hasta la fecha, han sido reportadas relativamente pocas sondas fluorescentes basadas en Cdots para detección de Hb, que es lograda especialmente mediante la estrategia del *quenching* de la fluorescencia [65, 133]. A pesar de la reciente mejora en la determinación de Hb, existe necesidad de desarrollar ensayos sencillos, sensibles, eficientes, rentables, razonablemente precisos, ecocompatibles y fáciles de usar para la detección incluso en trazas de la Hb para medir el contenido de Hb en orina y sangre para el diagnóstico clínico [133, 134, 137, 138].

Sin embargo, la identificación rápida, sensible y selectiva de Hb en muestras biológicas para el diagnóstico sigue siendo un desafío, debido al tratamiento complicado de las muestras y la necesidad de dispositivos baratos [135].

1.3. Ventajas de la detección luminiscente basada en Cdots con respecto a otras estrategias

La intensidad de fluorescencia de los Cdots suele mostrar una mayor estabilidad que otros nanomateriales, tales como nanopartículas de oro (AuNPs) o Qdots, frente a los cambios en el entorno químico o físico, como el pH, la fuerza iónica o incluso la presencia de muchas especies químicas. Hasta ahora, ha sido reportada la detección de unos pocos analitos usando sólo los Cdots [65]. Por lo tanto, el método de detección indirecta podría ser una forma prometedora de emplear la ventaja única de estos nanomateriales como sondas luminiscentes, para detectar especies químicas que no tienen un efecto directo en su fluorescencia [65]. En los experimentos descritos en este capítulo ha sido utilizada la rápida atenuación de la luminiscencia (*quenching* “*turn-off*”), en la cual se producen desactivaciones radiativas o no radiativas de la luminiscencia de los Cdots proporcionales a la concentración del analito de interés, en este caso la Hb. Cabe destacar que ese fenómeno se ve amplificado por la presencia de H₂O₂ en el sistema sensor en disolución. Hasta la fecha, han sido reportados relativamente pocos sensores basados en Cdots para la detección de Hb, todos ellos son de tipo fluorimétrico [65, 133, 134, 143]. Recientemente se ha descrito el fenómeno de fosforescencia a temperatura ambiente para los Cdots tanto en disolución como en estado sólido [144]. El empleo de la fosforescencia a temperatura ambiente (RTP) como técnica de medida ofrece diversas ventajas sobre la fluorescencia, incluida una mayor selectividad, una mejor tiempo de vida de emisión y la eliminación de interferencias espectrales por luz dispersa o autofluorescencia. Por otra parte, los sensores basados en luminiscencia son de gran interés debido a su sensibilidad y simplicidad, a veces en combinación con teléfonos inteligentes, lo que resulta en dispositivos portátiles [145, 146]. El estudio que se describe en el presente capítulo se centra en el uso de la intensidad y el tiempo de vida de RTP, lo que permite una determinación sensible, rápida y confiable de la concentración de analito [147, 148].

Existen diferentes métodos para obtener la velocidad de disminución del estado excitado, que es una medida del tiempo de vida de la luminiscencia, algunos de ellos basados en análisis del dominio de frecuencia, que requieren instrumentación costosa o pasos complejos de procesamiento de señal [149, 150]. Otros utilizan técnicas directas en el dominio del tiempo, que, en la mayoría de los casos, requieren circuitos complejos de lectura de alta velocidad debido a su corto tiempo de vida [151, 152]. Sin embargo, estas soluciones van en contra de la tendencia actual hacia sensores químicos inalámbricos (WCS) que, dentro del paradigma de Internet de las cosas (IoT), tiene como objetivo hacer una realidad la determinación (bio)analítica ubicua [153]. Este estudio presenta el desarrollo y la validación de un WCS que utiliza la medida de fosforescencia a temperatura ambiente de bioanalitos, la hemoglobina en este caso particular, basado en un algoritmo basado en Windows implementado en un dispositivo reconfigurable [154]. En consecuencia, se pretende en este trabajo el desarrollo de un método de bajo costo, simple y sensible para la determinación de bajos niveles de Hb mediante el uso de un sistema sensor basado en Cdots y H_2O_2 en disolución, tanto utilizando un espectrofotómetro de luminiscencia como un dispositivo portátil.

1.4. Mecanismos de detección de Hb basados en Cdots y H_2O_2

Aunque la Hb en sí misma es capaz de atenuar la fluorescencia de los Cdots, basándose en un efecto de filtro interno (IFE) que afecta tanto a los espectros de excitación como a los de emisión de los Cdots, la presencia de H_2O_2 mejora aún más la sensibilidad de la detección de Hb [65]. Un estudio publicado indica que la adición de H_2O_2 conduce a una atenuación más pronunciada de la intensidad de fluorescencia basada en la formación de radicales hidroxilo mediante la reacción de Fenton. Este radical tiene un potencial de reducción muy alto, de 2,74 V, lo que lo convierte en un agente oxidante muy eficiente: oxida eficazmente el grupo emisor de la superficie de los Cdots dopados con nitrógeno (N-Cdots), y eso da lugar a la atenuación de la intensidad de fluorescencia de los N-Cdots [143]. De acuerdo con los resultados reportados en la bibliografía y las observaciones experimentales de este estudio, Barati *et al.* [65] han propuestos un mecanismo para la atenuación de la fluorescencia por Hb del sistema sensor Cdots/ H_2O_2 .

Vale la pena mencionar que la adición de tiourea, como eliminador de radicales libres, a la mezcla de reacción que contiene Cdots/H₂O₂ y Hb previene el proceso de atenuación; eso apoya aún más que esta atenuación es causada por el radical hidroxilo [65]. En este capítulo se presenta el estudio de esa reacción y su empleo para la determinación de Hb, primero en el espectrómetro de luminiscencia y luego mediante un dispositivo móvil puesto a punto en nuestro laboratorio.

2. Objetivos.

El objetivo del trabajo de investigación descrito en este capítulo de la presente Tesis Doctoral ha consistido en el desarrollo de un sistema sensor en disolución basado en las propiedades luminiscentes de los Cdots, con el propósito de que ese sistema sensor fuera capaz de monitorizar la concentración de Hb tanto en un espectrofotómetro de luminiscencia como en un dispositivo portátil. Tras haber sintetizado y caracterizado luminiscentemente los Cdots, se optimizarán las variables de la reacción, tales como pH, concentración de reactivos y tiempo de respuesta. Del mismo modo, una vez optimizadas las variables de la reacción se optimizarán algunas de las variables del sistema instrumental portátil, tales como voltaje del diodo emisor de luz (LED), sensibilidad del fotodiodo, ajuste del rango de medida mediante sistema electrónico reconfigurable y tiempo de medida.

3. Caracterización y propiedades ópticas de los Cdots sintetizados.

3.1. Caracterización de los Cdots

En el Capítulo III de esta Tesis Doctoral se describe la síntesis de los Cdots a partir de ácido cítrico y etilendiamina (para más detalles, ver apartado 3 de ese Capítulo). En concreto, los que hemos denominado Cdots 3 se obtienen a partir de mezcla en agua de 10 g de ácido cítrico y 5 mL de etilendiamina que se calienta a 180°C en un bomba de acero de 50 mL forrada de Teflón. Tras enfriar a temperatura ambiente, se centrifuga la disolución a 3500 rpm durante 10 minutos.

Los Cdots se purificaron mediante diálisis utilizando una membrana de 1kD. El rendimiento calculado tras liofilizar es del 0,2 %. De manera general, la formación de Cdots dopados con nitrógeno implica principalmente dos procesos: condensación y carbonización. Durante estos procesos, los grupos carboxilo e hidroxilo del ácido cítrico y los grupos amino de la etilendiamina experimentan reacciones complejas de condensación y carbonización, que implican una condensación intramolecular para formar tanto fluoróforos, moléculas pequeñas como el ácido 5-oxo-1,2,3,5-tetrahidroimidazo[1,2a]piridin-7-carboxílico (Figura 3) así como Cdots dopados con nitrógeno que contienen un núcleo de carbono [155]. Se supone que los fluoróforos moleculares resultantes se ubican en la superficie y / o dentro de los Cdots.

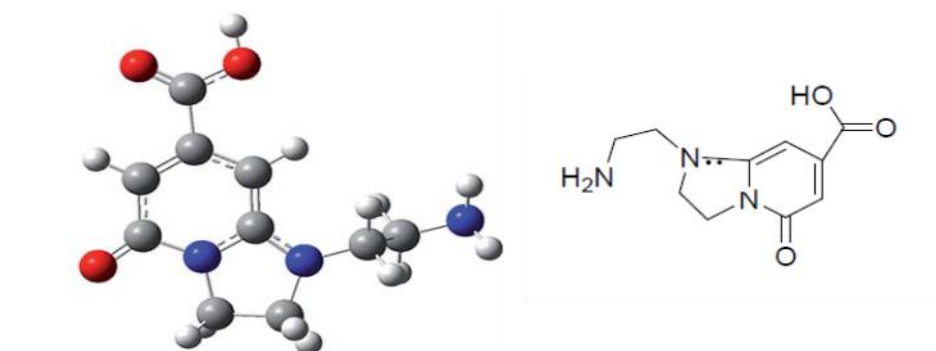


Figura 3. Ácido 5-oxo-1,2,3,5-tetrahidroimidazo[1,2a]piridin-7-carboxílico.

El tamaño, la morfología y la estructura de los Cdots sintetizados se estudiaron mediante diversas técnicas como son: microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HR-TEM), espectrometría infrarroja de transformada de Fourier (FTIR), difracción de rayos X (XRD), espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS) y dispersión dinámica de luz (DLS). La imagen HR-TEM de los Cdots muestra que son esféricos y con un grado de aglomeración bajo (Figura 4A). El histograma de distribución del tamaño de partícula obtenido a partir de la imagen HR-TEM (ver inserto Figura 4A) muestra que el tamaño de los Cdots se distribuye en un rango estrecho de 1 a 5 nm, con un tamaño de partícula promedio de 2,5 nm y un tamaño normal de partícula obtenido por medidas de DLS (Figura 3B).

Los datos de DLS (Figura 4B) indican un radio hidrodinámico promedio de 10 nm. Esta diferencia es normal ya que cuando una partícula se mueve en un medio líquido adquiere carga eléctrica. Esta capa influye en el movimiento de la partícula, por lo que el diámetro de la partícula medido por DLS, que se conoce como diámetro hidrodinámico, habitualmente es superior al diámetro que se mide con un microscopio electrónico de transmisión (TEM). El grosor de esa capa depende de diversos factores, entre otros de la conductividad eléctrica del líquido en que están dispersos los Cdots. El análisis elemental por EDX indica que la composición de los Cdots muestra la presencia de C, N y O, es decir que dichos elementos están presentes en la composición de los Cdots (Figura 4C). Adicionalmente, información sobre la composición elemental de los Cdots se obtuvo mediante XPS. Esta técnica permite registrar los espectros de los fotoelectrones inducidos por fotones de rayos X al incidir sobre la muestra. Esta espectroscopia es semicuantitativa y de baja resolución espacial, es habitual un error del 10%, y se emplea para estimar la estequiometría, así como el estado químico y la estructura electrónica de los elementos presentes en los Cdots en nuestro caso. Los datos obtenidos para la composición elemental de los Cdots indican la presencia de un pico de carbono (C1s) a aproximadamente 284 eV, un pico de oxígeno (O1s) a aproximadamente 530 eV y un pico de nitrógeno (N1s) a aproximadamente 398 eV. Además, la cuantificación atómica muestra el 69,37% de C1s, 16,62% de O1s y 14,02% de átomos de N1s (Figura 4D). Por otra parte, el patrón XRD de los Cdots (Figura 4E) muestra un pico de difracción ancho a $2\Phi = 20,5^\circ$ lo que sugiere que los Cdots sintetizados son un material amorfo como era de esperar. El espectro FTIR de los Cdots (Figura 4F) muestra bandas características de estiramiento de COOH a 3440 cm^{-1} y 1637 cm^{-1} ; la de flexión de NH a 1585 cm^{-1} ; el estiramiento de C – N a 1122 cm^{-1} ; y el estiramiento asimétrico y simétrico de CH a 2950 y 2820 cm^{-1} , respectivamente. Estos datos sugieren la presencia de diferentes grupos funcionales como -OH, -COOH y -NH₂ en la superficie de los Cdots [156].

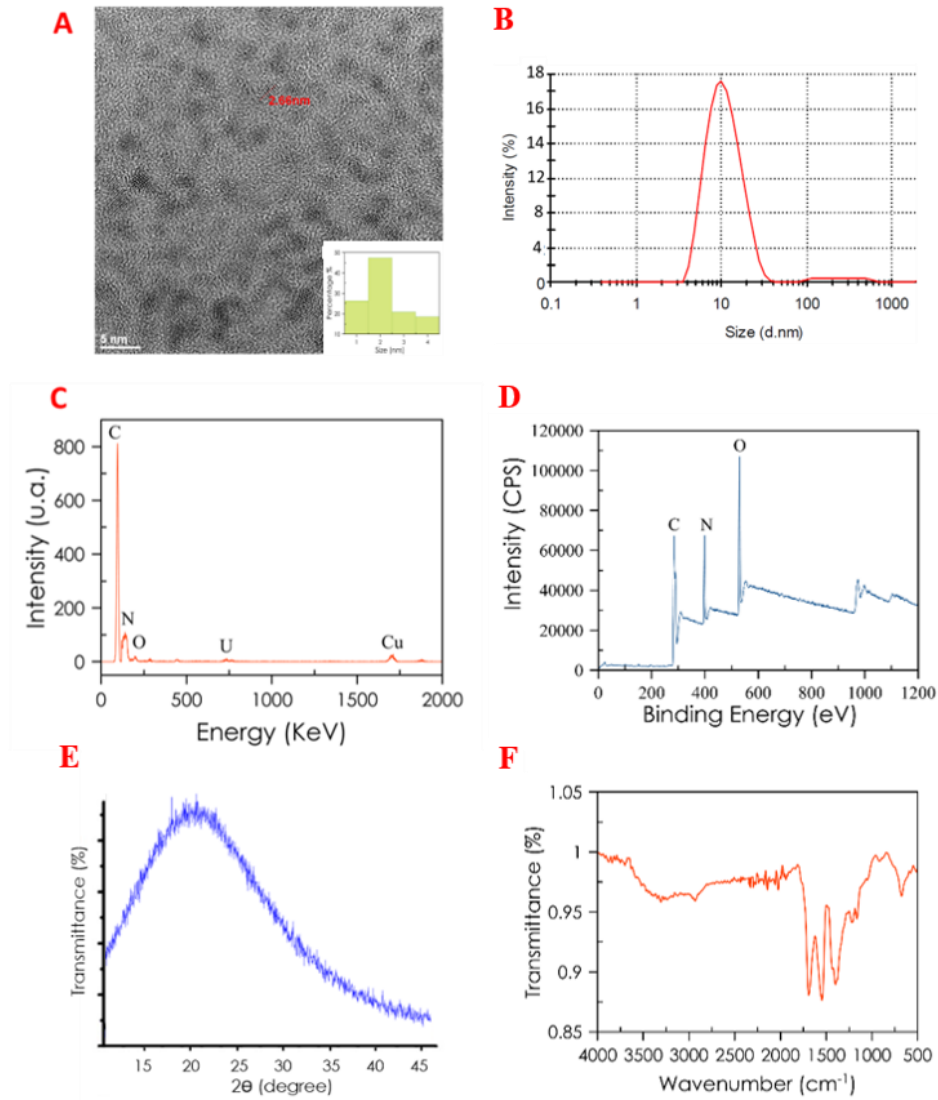


Figura 4. Caracterización de los Cdots. **A)** imagen HR-TEM. **B)** Distribución del tamaño de los Cdots. **C)** Espectro EDX. **D)** Espectros XPS: pico C1s: 284 eV; pico N1s: 398 eV y pico O1s: 530 eV. **E)** Patrón XRD y **F)** Espectro FTIR de los Cdots.

3.2. Propiedades ópticas de los Cdots sintetizados.

La presencia de diferentes grupos en la superficie de los Cdots tales como hidroxilo, amino o carboxilo mejora su estabilidad y modula las propiedades luminiscentes, lo que ayuda a encontrar nuevas aplicaciones analíticas para los Cdots. Los Cdots sintetizados muestran un espectro de absorción UV-Vis con una banda centrada a 350 nm y atribuida a una transición $n - \pi^*$ de enlaces C=O [65] (Figura 5A) y un espectro de emisión que va de aproximadamente 400 a 550 nm con un comportamiento de emisión

independiente de la excitación y una longitud de onda de luminiscencia máxima a 442 nm con una anchura a media altura (FWHM) de alrededor de 110 nm (Figura 5B).

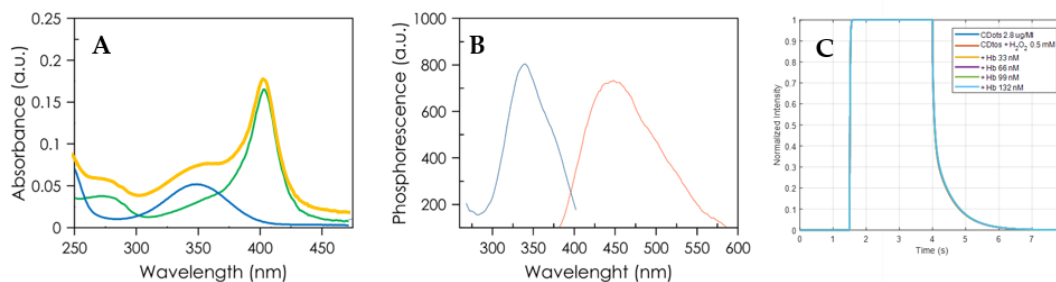


Figura 5. **A)** Espectros de absorción UV-Vis normalizados de una disolución de Cdots ($2,8 \times 10^{-3} \text{ mg mL}^{-1}$, línea azul), de una disolución de Hb $0,2 \mu\text{M}$ (línea verde) y de una disolución de Cdots y Hb (línea amarilla) en tampón $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ $0,02 \text{ M}$ $\text{pH} = 4,7$. **B)** Espectros de fosforescencia a temperatura ambiente de los Cdots ($2,8 \times 10^{-3} \text{ mg mL}^{-1}$): espectro de excitación (línea azul) y espectro de emisión (línea roja). **C)** Decaimiento de fotoluminiscencia normalizada para diferentes concentraciones de Hb. Se eliminó el desplazamiento de las curvas.

Debe tenerse en cuenta que los Cdots sintetizados exhiben dos procesos de fotoluminiscencia que compiten simultáneamente (es decir, emisión de fluorescencia y de fosforescencia), ambos emitiendo aproximadamente en mismo rango espectral. En el estudio realizado por Yan *et al.* [157] sobre Cdots sintetizados a partir de ácido cítrico y etilendiamina, al igual que en este estudio, se atribuye la fosforescencia observada tanto a los grupos carbonilo aromáticos presentes como a la estructura gráfica de los Cdots que es similar a la estructura de los hidrocarburos aromáticos policíclicos, compuestos bien conocidos por su emisión fosforescente. El rendimiento cuántico (QY) de fluorescencia relativa de los Cdots ha sido calculado como descrito en otra parte (ver Capítulo II, Apartado 5). El QY de fluorescencia relativa de los Cdots obtenido usando sulfato de quinina como estándar es $0,41 \pm 0,05$ como el promedio de tres medidas (Tabla 1).

Tabla 1. Rendimiento cuántico de fluorescencia (QY) de los Cdots.

Muestra	λ_{MAX} absorción (nm)	λ_{MAX} emisión	Rendimiento cuántico (Φ)
Sulfato de quinina	348	450	0,54 (100%)
Cdots 3	350	450	0,41 (76%)

4. Mecanismo de atenuación de la luminiscencia de los Cdots por Hb.

El espectro de la Hb presenta una banda significativa a 407 nm y otra menor a 280 nm. Por su parte, la disolución acuosa de Cdots luminiscentes tras la adición de Hb muestra una superposición en los espectros de absorción por lo que hay una atenuación rápida y un pequeño desplazamiento al rojo en sus espectros de emisión. La atenuación se atribuye al efecto de filtro interno (IFE) por la superposición parcial de los espectros de Hb con los espectros de emisión de Cdots [158]. Para confirmar este mecanismo, además de la superposición en los espectros, se calcula el tiempo de vida del sistema. Esto se confirma por el tiempo de vida de fosforescencia calculada con el instrumento portátil que se puso a punto en este estudio y que se describirá mas adelante (ver Figura 4C). Utilizando una ventana de tiempo de $T_1 = T_2 = T_3 = 1,5$ s y un tiempo de retraso de $t_d = 1$ ms se calculó una vida media de $\tau = 228,8 \pm 4,5$ ms. Estos resultados muestran que el instrumento portátil desarrollado es capaz de medir tiempos de vida de fosforescencia, lo cual es muy interesante para futuras aplicaciones de detección en sensores. Por otra parte, la adición de H_2O_2 a la disolución que contiene Cdots y Hb aumenta drásticamente la atenuación de la luminiscencia de Cdots. Barati *et al.* [65] han sugerido para explicar este efecto del peróxido de hidrógeno un mecanismo de atenuación diferente del IFE. En resumen, en un primer paso, Hb reacciona con H_2O_2 generando especies reactivas de oxígeno (ROS), principalmente hidroxilo ($^{\circ}OH$) y radicales superóxido ($O_2^{\cdot-}$), que dan lugar a la degradación del grupo hemo y la liberación de hierro. La posterior oxidación de los hidroxilos superficiales de los Cdots modifica la estructura de la superficie, lo que lleva a una atenuación de la luminiscencia [159].

Para determinar si los Cdots podrían utilizarse como una sonda de luminiscencia para la detección directa de Hb, en primer lugar se han registrado los cambios en la intensidad de la absorción de los Cdots tras la adición gradual de Hb en el rango de 0 a 0,2 μM (Figura 6).

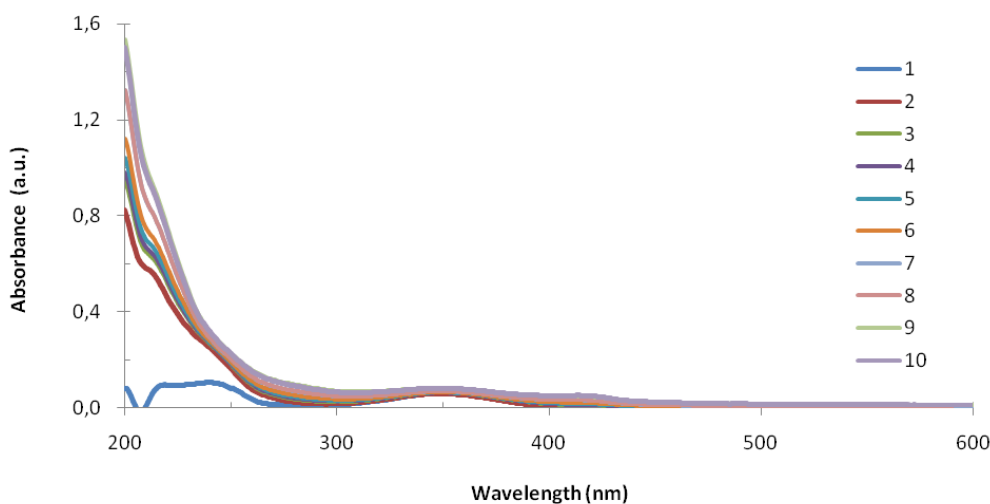


Figura 6. Espectros de absorción de los Cdots solos (1) y de la disolución Cdots/ H_2O_2 0,5 mM al agregar diferentes concentraciones de Hb. De abajo a arriba: 0 (2); 0,025 (3); 0,05 (4); 0,075 (5); 0,1 (6); 0,125 (7); 0,150 (8); 0,175 (9) y 0,2 μM (10).

Como se ve, la adición de Hb apenas induce un aumento en la intensidad de la absorción acompañado por la aparición de una segunda banda a 407 nm. Si se mira el espectro de absorción de Hb, se observa que esa banda a 407 nm se corresponde con la absorción de la Hb, lo que confirma la superposición espectral con el espectro de los Cdots. Por otra parte, el espectro de la absorción de una mezcla de Cdots y Hb presenta una banda intensa a 407 nm y otra menos significativa a 350 nm que se refieren a la absorción de la Hb y de los Cdots, respectivamente (Figura 7). Sin embargo, la absorción se detiene de manera significativa por la mezcla de Hb y H_2O_2 . Además, no se observa ningún cambio espectral evidente en los espectros de absorción de los Cdots solos o en presencia de H_2O_2 0,5 mM. Estas observaciones obviamente indican que el proceso de atenuación sigue un mecanismo diferente en presencia de H_2O_2 , en el que la reacción entre Hb y H_2O_2 probablemente juega un papel importante. Por lo que vemos en bibliografía, se ha prestado mucha atención a la reacción de H_2O_2 con una sustancia rica en hierro como es la Hb.

Efectivamente, ha sido reportado que la Hb podría actuar como un catalizador biológico de tipo Fenton, donde el ion Fe^{2+} descompone el H_2O_2 para formar metahemoglobina (MetHb), radical hidroxilo (OH^\cdot) y anión hidroxilo.

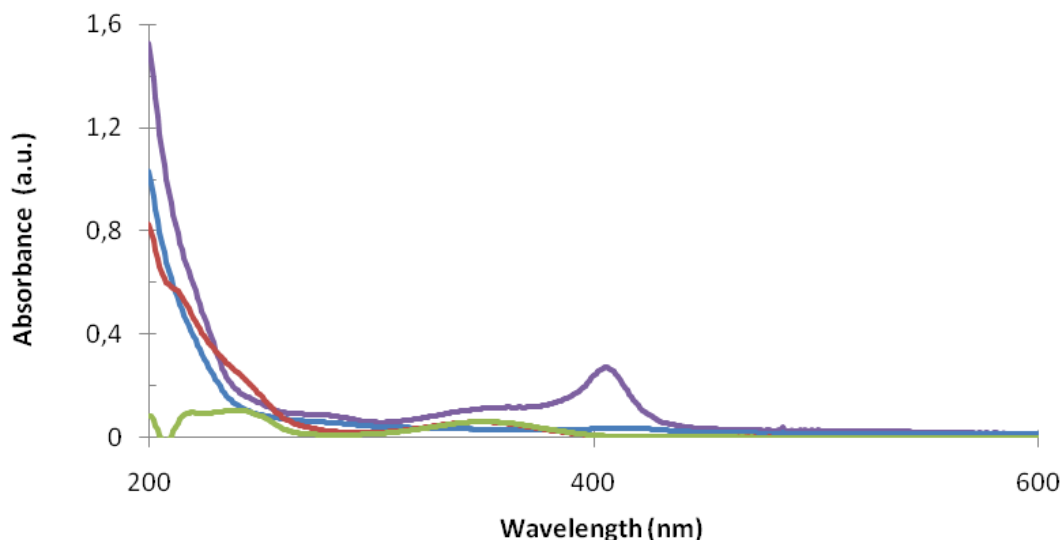


Figura 7. Intensidad de absorción normalizada de los Cdots en solución tampón $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0,02 M (pH = 4,7) en presencia de Hb (0,2 μM), una combinación de H_2O_2 (0,5 mM) y Hb (0,2 μM), Cdots y H_2O_2 0,5 mM, los Cdots 3 solos (en violeta, azul, rojo y verde, respectivamente).

Además, ha sido reportado que la reacción de Hb con un ligero exceso molar de H_2O_2 conduce a la degradación del hemo y la liberación de hierro, que promovería la formación de radicales hidroxilo en la reacción de Fenton. Además, ha sido reportada la formación de $\text{Hb-Fe}^{4+}=\text{O}$ como oxidante fuerte intermedio durante la reacción de Hb con un ligero exceso de H_2O_2 . También ha sido detectada la formación de radicales superóxido (O_2^-) por la reacción de la ferril-Hb con el H_2O_2 . Sin embargo, de acuerdo con la reacción de Haber-Weiss, los radicales hidroxilo pueden generarse a partir de la interacción entre el superóxido y el H_2O_2 catalizados por ciertos iones de metales de transición, específicamente el hierro [65, 143]. Por otra parte, recientemente ha sido reportado el uso de Cdots como sondas de fluorescencia para detectar los reactivos involucrados en las reacciones de Fenton o similares a Fenton, sugiriendo que la oxidación del Fe^{2+} a Fe^{3+} por H_2O_2 , y la posterior transferencia de electrones entre el estado excitado de los Cdots y los iones Fe^{3+} complejados en su superficie da como resultado una fuerte atenuación de la fluorescencia [65].

Debido a que la Hb es una metaloproteína de hierro bien conocida, ha sido investigada la respuesta fluorescente de los Cdots con concentraciones variables de iones Fe^{2+} y Fe^{3+} . El resultado ha sido que en presencia de H_2O_2 y Fe^{2+} la fluorescencia de los Cdots se atenúa casi por completo. Por lo tanto, se puede concluir que los radicales hidroxilo generados a partir de H_2O_2 en presencia de Fe^{2+} son responsables de la atenuación de la fluorescencia [65]. La naturaleza de oxidantes fuertes de las ROS está bien documentada [65, 143]; asimismo se ha informado que las propiedades luminiscentes de los Cdots se ven muy afectadas por el estado de su superficie [5, 46, 65, 68]. Por lo tanto, se puede suponer que la oxidación de los grupos hidroxilo de la superficie de los Cdots por los radicales hidroxilos generados en disolución puede modificar la superficie de los Cdots y conducir a la atenuación de su luminiscencia.

5. Optimización del sistema en disolución basado en Cdots y H_2O_2 para determinación de la Hb.

Antes de poder usar el sistema en disolución Cdots/ H_2O_2 para la determinación de Hb, se estudio el efecto de algunos factores influyentes como son el tiempo de reacción, el pH y la concentración de H_2O_2 .

En primer lugar, se estudió el tiempo de equilibrio (resultados no mostrados), encontrando que 6 minutos son suficientes para obtener medidas estables. La influencia del pH en la respuesta ha sido investigada en el rango entre 1,5 y 9,5 utilizando tampones $\text{NaH}_2\text{PO}_4/ \text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0,02 M). La mayor atenuación ocurre a pH 4, disminuyendo drásticamente tanto en medios más ácidos como básicos (Figura 8A). Del mismo modo, la concentración de H_2O_2 ejerce un gran efecto sobre la atenuación de la luminiscencia, siendo 0,5 mM el valor óptimo (Figura 8B).

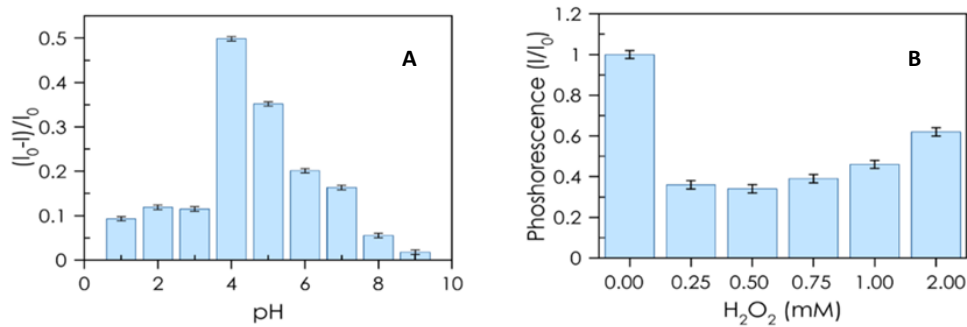


Figura 8. A) Dependencia del pH de la atenuación de la luminiscencia. Cdots $2,8 \times 10^{-3}$ mg mL⁻¹; H₂O₂ 0,5 mM; Hb 1 μ M en tampones de fosfato 0,02 M. B) Influencia de la concentración de H₂O₂ en la atenuación de la luminiscencia. Cdots $2,8 \times 10^{-3}$ mg mL⁻¹; Hb 1 μ M en tampón fosfato 0,02 M (NaH₂PO₄ / Na₂HPO₄) pH = 4,7.

6. Determinación de la Hb en el sistema sensor Cdots/ H₂O₂ en espectrómetro de luminiscencia.

Para estudiar la dependencia de la atenuación de luminiscencia con la concentración de hemoglobina realizando las medidas en el espectrómetro de luminiscencia, se prepararon una serie de soluciones de los Cdots (35 μ L) y H₂O₂ (100 μ L) de sus disoluciones madre y se diluyeron a 3 mL con tampón fosfato (NaH₂PO₄/ Na₂HPO₄ 0,02 M, pH 4,7) para lograr una concentración final de $2,8 \times 10^{-3}$ mg mL⁻¹ de Cdots y 0,5 mM de H₂O₂. Después, se añadieron diversas concentraciones de Hb a esas mezclas anteriores a partir de una solución madre de Hb 300 μ M. Las alícuotas fueron dejadas en el frigorífico tras la adición de los reactivos (es decir, H₂O₂ y Hb, respectivamente) y entre las medidas. La intensidad de emisión de luminiscencia de estas disoluciones de 3 mL se midió después de 6 minutos de reposo a temperatura ambiente utilizando una celda de cuarzo estándar de 10 mm. La función de calibrado se obtuvo utilizando una función tipo Stern-Volmer a partir del valor promedio de tres medidas independientes. Se ensayaron dos tipos de Cdots, los que hemos llamado en el Capítulo III Cdots 2 y Cdots 3, que son los que hemos utilizado en este capítulo. Con los Cdots 2 se ha obtenido una función de calibrado lineal que obedece la ecuación $y = -0,206x + 0,937$, con un rango dinámico lineal hasta 3 μ M y un coeficiente de correlación de 0,968 (Figura 9).

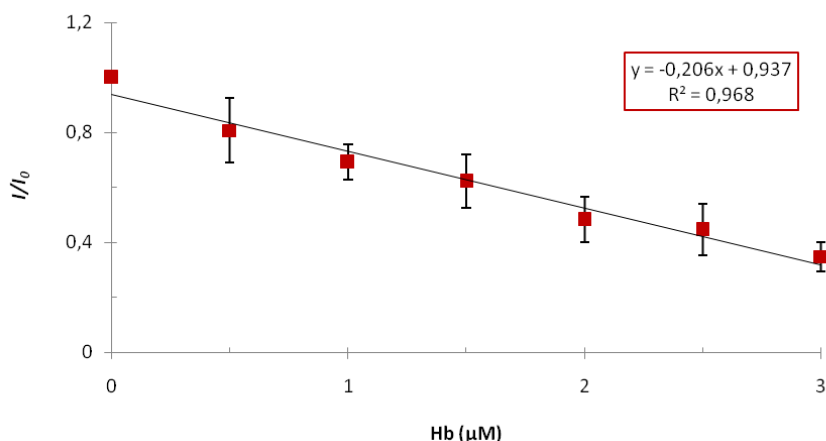


Figura 9. La dependencia de la intensidad de luminiscencia utilizando Cdots 2 con la concentración de Hb ($\lambda_{ex} = 340$ nm; $\lambda_{em} = 442$ nm).

En el caso de utilizar los Cdots 3 la función resulta ser $y = -2,142x + 0,921$, con un rango dinámico lineal hasta $0,3 \mu\text{M}$, y un coeficiente de correlación de $0,921$. El sistema de detección muestra una alta reproducibilidad, con una desviación estándar relativa (RSD) del $0,7\%$ ($n = 3$) para una concentración de $0,3 \mu\text{M}$. Observamos que el sistema basado en los Cdots 3 resultó más sensible (Figura 10).

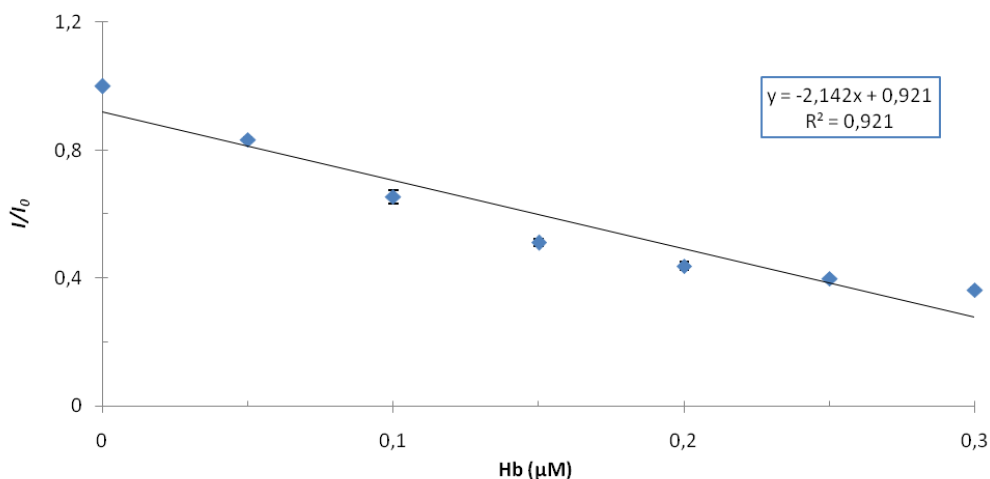
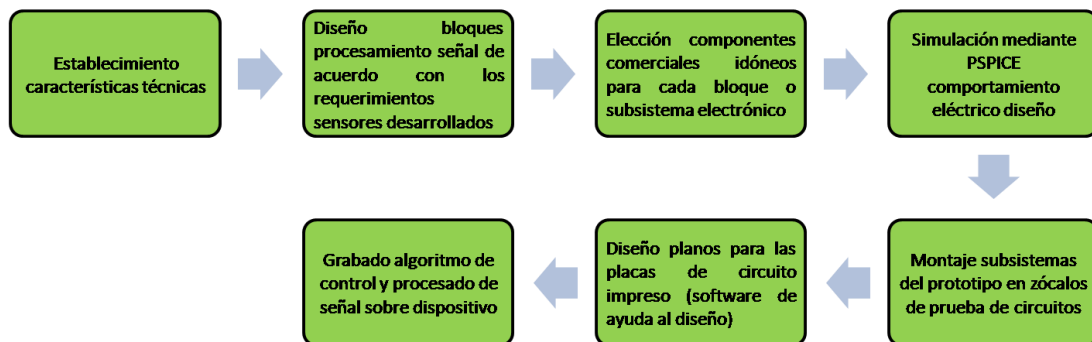


Figura 10. La dependencia de la intensidad de la luminiscencia al agregar diferentes concentraciones de Hb (de arriba a abajo: $0; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5$ y $3 \mu\text{M}$; $\lambda_{ex} = 340$ nm; $\lambda_{em} = 442$ nm) en el rango lineal hasta $0,3 \mu\text{M}$. El recuadro muestra la función de calibrado y el coeficiente de correlación R^2 .

Se ha calculado el LOD utilizando el criterio estándar $LOD = 3\sigma/\text{pendiente}$, donde σ es la desviación estándar ($n = 10$) de la diferencia en intensidad de luminiscencia entre la disolución de Cdots y el blanco. El LOD resultó ser de $0,02 \mu\text{M}$.

7. Desarrollo del prototipo de instrumentación portátil para medidas de luminiscencia

En el desarrollo de prototipos de instrumentación portátil basados en microcontrolador, como es el caso aquí presentado el método de trabajo fue el denominado *up-down* con múltiples pasos a etapas anteriores del diseño para mejora y realimentación (Esquema 1).



Esquema 1. Pasos a seguir para el desarrollo del instrumento portátil.

En este caso los pasos a seguir fueron:

- Establecimiento de unas especificaciones lo más concretas posibles del instrumento, en lo referente a características técnicas, nivel de resolución y rangos de medida y de operación, así como la ergonomía del mismo, indicando interfaces con el mundo exterior.
- Diseño con ayuda del computador de los distintos bloques de procesamiento de la señal de acuerdo con los requerimientos específicos de los sensores desarrollados.
- Elección de los componentes comerciales idóneos para cada bloque o subsistema electrónico.

- Simulación mediante PSPICE del comportamiento eléctrico del diseño, para su mejora y la evaluación *a priori* de los posibles puntos débiles del mismo.
- Montaje de los subsistemas del prototipo, tanto de manera individual como sus interacciones, en zócalos de prueba de circuitos. En este paso, fueron medidas las distintas magnitudes de interés en cada uno de ellos para refinar y mejorar el diseño.
- Una vez obtenidos resultados satisfactorios en los zócalos de prueba, con software de ayuda al diseño, se diseñaron los planos para las placas de circuito impreso.
- Paralelamente a estos 4 últimos pasos, con herramientas de simulación, emulación y programación de microcontroladores y los circuitos programables reconfigurables, se procedió a grabar el algoritmo de control y procesado de señal sobre este dispositivo.

7.1 Configuración de medida para el dispositivo portátil

La configuración de medida consiste básicamente en tres bloques principales: una fuente luminosa de excitación, un fotodiodo y el controlador analógico / digital reconfigurable. Se utilizó como fuente de excitación ($\lambda = 365$ nm) de los Cdots el LED UV EOLD-365-525 (OSA Opto Light, Berlín, Alemania), ubicados en una cámara oscura especialmente diseñada para este propósito. La emisión de luminiscencia se midió utilizando un fotodiodo S2387-66R (Hamamatsu Photonics K.K., Hamamatsu, Japón) alineado perpendicularmente a la emisión del LED UV, como se puede ver en el diagrama de bloques del instrumento desarrollado (Figura 11).

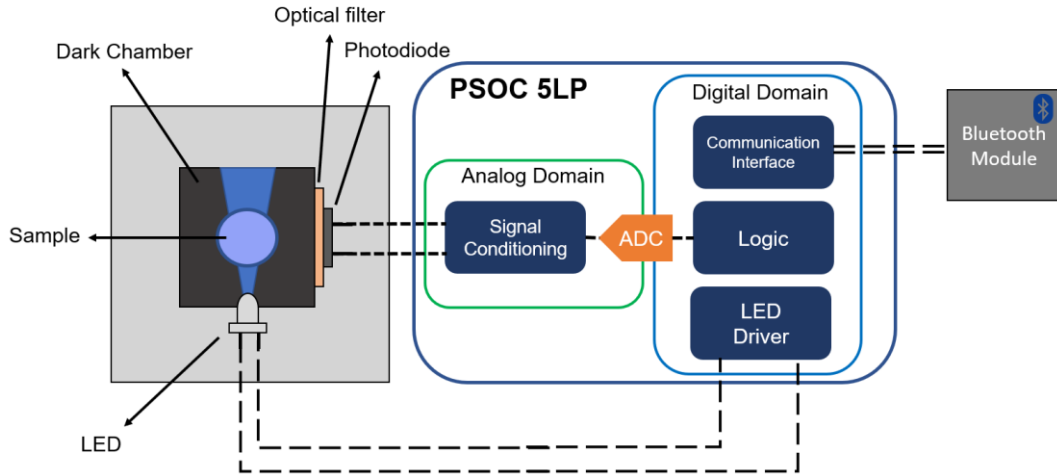


Figura 11. Diagrama de bloques del dispositivo desarrollado que muestra el módulo electrónico y la configuración de medida.

Para considerar sólo el efecto de la luminiscencia de los Cdots, se colocó un filtro óptico (KOOD International, Japón) directamente frente al fotodiodo para evitar la influencia de reflejos de luz indeseables. El control del LED de excitación y la adquisición de la señal del fotodiodo se llevaron a cabo utilizando un Programmable System-on Chip 5LP (Cypress Semiconductor, California, USA), en concreto el kit de desarrollo CY8CKIT-010. Este Programmable System-on-Chip (PSoC) tiene una arquitectura reconfigurable que integra un dominio analógico programable junto con un potente motor de procesamiento de señales (Arm® Cortex®-M0 + de 32 bits), que permite el acondicionamiento de señales analógicas y el procesamiento digital, y proporciona una interfaz de control de comunicación. El diagrama de bloques del instrumento desarrollado que se esquematiza en la Figura 11 muestra que sólo el módulo fotoelectrónico (LED y fotodiodo) y el módulo Bluetooth son componentes fuera del chip. Por lo tanto, la señal obtenida del fotodiodo está totalmente condicionada utilizando el dominio analógico del PSoC antes de su conversión al dominio digital.

7.2. Algoritmo de medida

La intensidad de fosforescencia y el tiempo de vida del decaimiento de luminiscencia se obtienen siguiendo un método similar al propuesto por López-Ruiz *et al.* [154], que se

basa en la integración de la señal de luminiscencia en tres ventanas de tiempo diferentes (Figura 12).

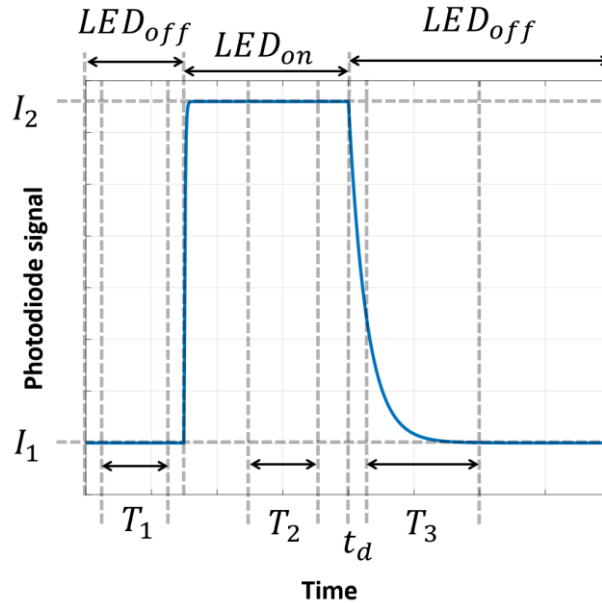


Figura 12. Esquema de medida basado en las tres ventanas de tiempo.

Primero, antes de la excitación óptica de la muestra, la señal obtenida del fotodiodo se integra en la ventana de tiempo T_1 . Durante este intervalo, el valor de la señal es casi constante y corresponde al desplazamiento debido a la corriente oscura del fotodiodo. En segundo lugar, la muestra se excita ópticamente después de lo cual, una vez que la luminiscencia alcanza el estado estacionario, la señal se integra en una ventana de tiempo T_2 . Finalmente, el LED se apaga nuevamente y, después de esperar un tiempo de retraso t_d para evitar la luminiscencia de fondo, la señal se integra nuevamente en la ventana de tiempo T_3 , que es lo suficientemente amplia como para cubrir todo el tiempo de decaimiento. Por lo tanto, tanto el desplazamiento (I_1) como la intensidad de la luminiscencia en estado estacionario excitado (I_2) se pueden obtener de la ecuación (1).

$$I_i = \frac{D_i}{T_i}, \quad i = 1, 2 \quad (1)$$

siendo D_i el resultado de la integración de la señal en la ventana de tiempo T_i .

Además, ya se ha demostrado que para una ventana de tiempo mucho más larga que el tiempo de vida, $T_3 \gg \tau$, el valor de la vida media de un exponencial de enésimo orden se puede obtener suponiendo una disminución mono-exponencial con un tiempo de vida τ teórico. Por lo tanto, la integración de la disminución en la ventana de tiempo T_3 da como resultado:

$$D_3 = \int_{t_d}^{T_3} (I_2 e^{-(t/\tau)} + I_1) dt \cong I_2 \tau + I_1 (T_3 - t_d) \quad (2)$$

siempre que $T_3 \gg \tau$ y $t_d \ll \tau$.

Luego, el tiempo de vida puede ser determinado de las ecuaciones (1) y (2):

$$\tau = \frac{D_3 - \frac{D_1}{T_1} (T_3 - t_d)}{\frac{D_2}{T_2}} \quad (3)$$

Además, también hemos obtenido la relación de cambio en la amplitud de la disminución de la fosforescencia al objeto de calcular la concentración del analito. Para eso, ha sido utilizada el área medida en la ventana de tiempo T_3 , como se indica en la ecuación (4).

$$\frac{I_o}{I_i} = \frac{D_{3o} - \frac{D_1}{T_1} \cdot T_3}{D_{3i} - \frac{D_1}{T_1} \cdot T_3} \quad (4)$$

siendo I_o la amplitud en ausencia del analito e I_i la amplitud obtenida para una concentración de analito dada.

7.3. Implementación del prototipo y su aplicación

Como se ha descrito anteriormente, el algoritmo de medida de la intensidad de fosforescencia y el tiempo de vida se implementó en un dispositivo reconfigurable cuya configuración de hardware completa se muestra a continuación (Figura 13).

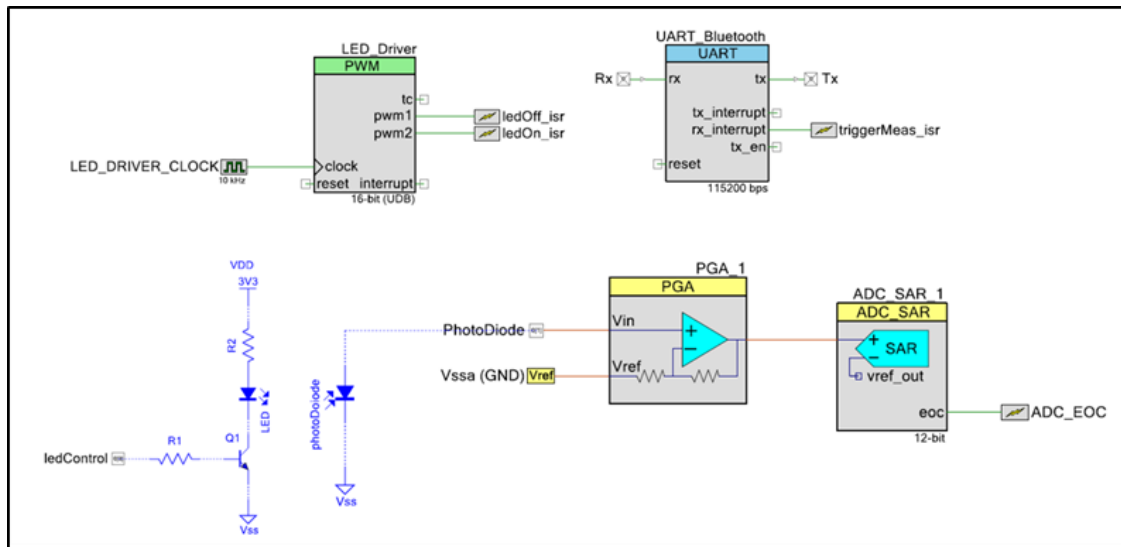


Figura 13. Diagrama de bloques del instrumento desarrollado que muestra la parte electrónica y la configuración de medida.

Este diseño se implementó utilizando el entorno de diseño integrado PSoC Creator Integrated Design Environment (IDE), que permite configurar los diferentes módulos de hardware e implementar el firmware. Como se ve en la Figura 11, el controlador del LED responsable de controlar la fuente de excitación se implementó a través del módulo Pulse-Width Modulation (PWM). Este módulo genera dos señales digitales que están conectadas a dos interruptores activados por hardware para encender/apagar el LED. Esta implementación basada en interruptores permite monitorear los intervalos de tiempo en los que el LED de excitación se enciende/apaga con mucha precisión. La señal obtenida del fotodiodo se amplifica ($A_v = 4 \text{ V/V}$) utilizando un amplificador de ganancia programable (PGA) para adaptar la señal al rango dinámico del módulo convertidor digital analógico (ADC), que se ha configurado de un solo extremo. El ADC convierte la señal registrada desde el fotodiodo al dominio digital a una velocidad de muestreo de 250 kHz y una resolución de 12 bits, generando una interrupción de fin de conversión (EOC) cada vez que se completa una nueva conversión. Por lo tanto, la integración de la señal en cada ventana de tiempo resulta en las ecuaciones (5) y (6):

$$D_i = \sum_{j=0}^{N=\frac{T_i}{T_s}} V_{ADCj} \cdot T_s = F_s \cdot \sum_{j=0}^{T_i \cdot F_s} V_{ADCj}, \quad i = 1,2 \quad (5)$$

$$D_3 = \sum_{j=0}^{N=\frac{T_3}{T_S}} (V_{ADC_j} - \frac{D_1}{T_1}) \cdot T_S = F_S \cdot \sum_{j=0}^{T_3 \cdot F_S} (V_{ADC_j} - \frac{D_1}{T_1}) \quad (6)$$

siendo T_S y F_S el periodo y la frecuencia de muestreo, respectivamente y V_{ADC_j} el valor de la conversión j^{th} .

Una vez que el tiempo de vida se calcula utilizando la ecuación (3), se envía mediante la interfaz Bluetooth, implementada como un módulo Bluetooth de baja energía (BLE) externo basado en el SoC CC2541 (Texas Instrument, Texas, EE. UU.). Un módulo receptor-transmisor asíncrono universal dúplex completo (UART) es la interfaz con el modulo BLE, que trabaja como esclavo de un dispositivo central/máster. En este trabajo el dispositivo máster es un *smartphone* que utiliza una app para visualización de datos y realizar nuevas medidas. Finalmente, fue implementado el dispositivo portátil que se muestra a continuación (Figura 14).

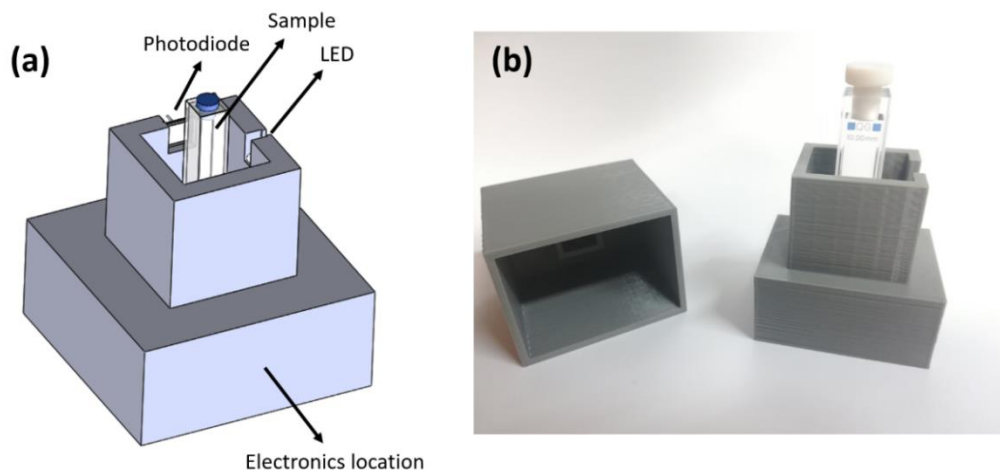


Figura 14. Modelo 3D (a) y vista real (b) del instrumento portátil final.

El dispositivo móvil demostró ser mucho más sensible que el espectrómetro de luminiscencia para las medidas de la atenuación de luminiscencia del sistema sensor Cdots/H₂O₂ por parte del analito Hb.

Por lo tanto, se decidió emplear una concentración inferior de analito. El dispositivo portátil fue diseñado para una curva de calibrado de Hb hasta 150 nM. El ensayo fue realizado por duplicado y en continuo, tomando 10 valores para cada muestra, que fue preparada como descrito anteriormente.

8. Resultados y Discusión

8.1. Caracterización analítica del sensor implementado en el instrumento portátil para la determinación RTP de la Hb

La viabilidad del instrumento desarrollado se probó utilizando los Cdots como una sonda fosforescente y midiendo el cambio en la atenuación de la fosforescencia en presencia de Hb a diferentes concentraciones de ensayo. Se estableció la ecuación de Stern-Volmer basada en la intensidad (I_0 / I) usando la ecuación (4) para diferentes concentraciones de Hb. Esta representación permite establecer una función de calibrado para determinar la concentración de analito (Hb) a partir de la relación entre la intensidad en ausencia de Hb y la intensidad medida para una determinada concentración de Hb. La función de calibrado obtenida en este caso se muestra en la ecuación (7).

$$\frac{I_0}{I} = 320 \cdot 10^{-6} \cdot Hb + 1; R^2 = 0,9976 \quad (7)$$

El rango dinámico lineal es de 19 nM a 125 nM y el coeficiente de correlación de 0,9976. El LOD se calculó utilizando los criterios estándar $LOD = 3\sigma /$ pendiente, donde σ es la desviación estándar ($n = 20$) de la diferencia en la intensidad de luminiscencia entre una solución de Cdots y un blanco, y el límite de cuantificación (LOQ), calculado como $10\sigma /$ pendiente. Con estos criterios, el valor del LOD fue de 6,2 nM y el LOQ de 18,8 nM. La concentración de Hb podría extraerse utilizando esta función de calibrado y la relación de intensidades previamente medida. Finalmente, la interfaz Bluetooth envió este valor a la aplicación de Android (Figura 15). La aplicación, además de funcionar simplemente visualizando este valor, sirve para realizar nuevas medidas.

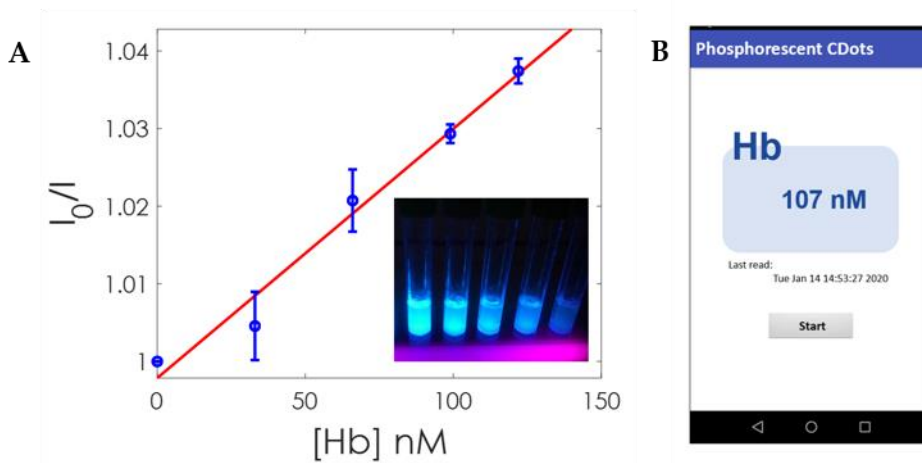


Figura 15. (A) Representación de Stern-Volmer basada en intensidad (I_0/I) para diferentes concentraciones de Hb. El recuadro muestra una fotografía con iluminación UV de diferentes concentraciones de Hb. (B) Captura de pantalla de la aplicación que muestra el resultado de una medida.

8.2. Estudio de interferencias

Uno de los principales desafíos en la determinación de Hb es la selectividad requerida en presencia de iones interferentes y diversas especies biológicamente importantes que se encuentran comúnmente en muestras reales y que pueden dificultar la aplicación analítica a la determinación de Hb. Para evaluar si este enfoque es suficientemente selectivo para la Hb, se registró la atenuación de una suspensión de Cdots en presencia de diferentes especies interferentes, tanto moléculas como iones (concentración final 10 μM) habitualmente encontrados en muestras de sangre, en concreto: ácido ascórbico, glucosa, ácido úrico, K^+ , Mg^{2+} , Na^+ y Ca^{2+} . Ninguna de estas especies provocó un efecto discernible sobre la respuesta de fosforescencia de los Cdots/ H_2O_2 para la determinación de Hb (Figura 16).

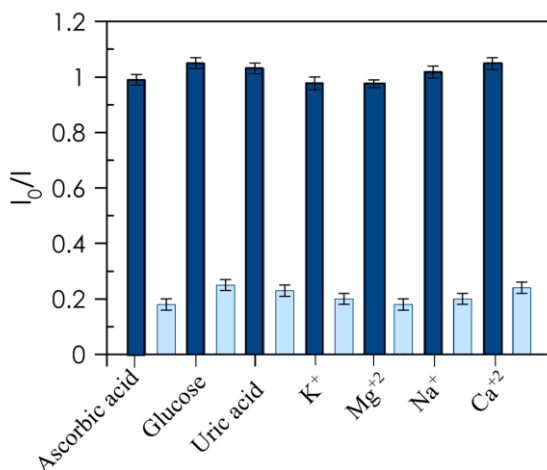


Figura 16. Selectividad del ensayo RTP. Respuesta de interferentes (10 μ M para ácido ascórbico, glucosa y ácido úrico y 0.1 mM para cationes) y respuesta de Hb (100 nM) en presencia de interferentes.

Estos resultados confirman que ni los analitos inorgánicos u orgánicos encontrados en la sangre interfieren con nuestro ensayo, validando la selectividad del sistema de fosforescencia hacia la Hb.

8.3. Aplicación al análisis de muestras reales.

A pesar de la buena selectividad de los Cdots fosforescentes para determinar Hb en presencia de iones interferentes, el problema de las interferencias inespecíficas es difícil de abordar debido a la complejidad compositiva inherente de las muestras biológicas reales. Para validar la selectividad del ensayo propuesto para la determinación de Hb en sangre, se analizaron muestras de dos voluntarios humanos sanos después de una gran dilución de las muestras para reducir cualquier interferencia. Además, la cuantificación después de la adición de una cantidad conocida de Hb (0,040 y 0,080 μ M) en las muestras de sangre diluida mostró un buen porcentaje de recuperación (Tabla 2). Estos resultados demostraron la buena precisión de los Cdots fosforescentes para la determinación de Hb en sangre humana.

Tabla 2. Determinación de Hb en muestras de sangre reales.

Muestra	Concentración de Hb			Recuperación (%)	
	Detectado (μM)	Sangre (mM)	Añadido (μM)		
Voluntario 1	0,050	10,500	0,040	0,052	93,6
			0,080	0,085	105,9
Voluntario 2	0,045	9,450	0,040	0,038	95,0
			0,080	0,087	108,4

8.4. Comparación de métodos basados en sensores para determinación de Hb

Se han comparado sensores para detección de Hb encontrados en la literatura, basados en Cdots o en otras metodologías, con los descritos en este capítulo de la Tesis Doctoral. A continuación se muestran dos tablas de comparación de parámetros analíticos de los sensores estudiados, tales como el rango dinámico lineal y el LOD. La primera se refiere a los sensores basados en Cdots para la determinación de Hb, incluso los descritos en ese capítulo de la presente Tesis Doctoral (Tabla 3). Como se puede ver, hay muy pocos sensores basados en Cdots para la detección de Hb que han sido reportados en la literatura. El LOD que presentan estos dispositivos analíticos oscila normalmente entre 0,1 y 20 nM. El sensor implementado en el instrumento portátil presenta un LOD de 6,2 nM, por lo tanto cabe dentro del rango encontrado en la literatura. El rango dinámico lineal para una detección fiable de Hb del sensor usado en el espectrómetro de luminiscencia está en el rango micromolar, más amplio con respecto a los sensores parecidos, cuyo rango normalmente abarca concentraciones nanomolares del analito, como el sensor implementado en el instrumento portátil. Por otra parte, las aplicaciones del sensor han sido primero utilizando disoluciones estándar del analito y luego en un ensayo en muestras reales. Han sido reportados en la literatura otros sensores que han sido capaces de detectar al analito, principalmente en muestras de sangre humana. Todos los sensores basados en Cdots para determinación de la Hb no muestran interferencias, porque no eran significativas o por no haber sido realizados estudios de selectividad. Las medidas han sido principalmente de tipo fluorimétrico. Mientras, hay que destacar que los sensores descritos en este trabajo han sido los únicos capaces de detectar el analito mediante medidas de tipo fosforimétrico, tanto en el espectrómetro de luminiscencia como en el instrumento portátil.

La determinación fosforimétrica de la Hb basada en el sistema Cdots/H₂O₂, aunque no tenga la mayor sensibilidad ni selectividad, tampoco necesita materiales caros y una preparación complicada del sistema sensor, y proporciona un análisis simple y fácil. En particular, su implementación en un instrumento portátil ha resultado prometedora, por su buena sensibilidad a bajas concentraciones de analito comparable con los sensores reportados en la literatura. Por cierto, harían falta más estudios para aplicaciones en muestras reales.

Tabla 3. Sensores basados en Cdots para detección de la Hb.

LOD y otros datos	Rango dinámico lineal	Aplicaciones	Interferencias significativas	Tipo medida	Ref.
0,4 nM	1-100 nM	Sangre humana	Ninguna	Fluorimetría	[65]
0,1 nM; RSD (%): 0,4-3,7.	1-4000 nM	Sangre y orina humanas	Ninguna	Fluorimetría	[133]
20 pM ($\lambda_{em}= 386$ nm); 2 nM ($\lambda_{em}= 530$ nm); 20 nM (I_{530}/I_{410}). RSD (n= 3; %): 2,7-4,1.	0,1-300 nM ($\lambda_{em}= 386$ nm); 5-500 nM ($\lambda_{em}= 530$ nm); 50-500 nM (I_{530}/I_{410}).	Sangre humana	Ninguna	Fluorimetría	[134]
-	0-10 μ M (concentración máxima ensayada)	En disolución	Ninguna	Fluorimetría	[143]
0,02 μ M (espectrómetro de luminiscencia); 6,2 nM (instrumento portátil).	0,06-3 μ M (espectrómetro de luminiscencia); 19-125 nM (instrumento portátil).	En disolución y en muestras de sangre humana	Ninguna	RTP	Este trabajo

La otra tabla (Tabla 4) se refiere a metodologías que no usaron Cdots para la determinación de la Hb. Como se puede ver de la tabla, el uso de otros sistemas sensores diferentes de los Cdots para la detección de la Hb sigue siendo mayoritario, al contrario de lo que ocurre con otros analitos, tales como los biotioles (ver Capítulo III, subapartado 6.8). Como se puede observar, el LOD de los sensores basados en otras metodologías cabe dentro del rango μM y nM , con más frecuencia en ese último. Esos sensores demuestran tener buena sensibilidad, sin embargo también los sensores basados en Cdots alcanzan esos LOD, incluso los sensores descritos en este capítulo de la presente Tesis Doctoral. Lo mismo ocurre con el rango dinámico lineal. En ambos casos suele ser bastante amplio, entre μM y nM , conforme con el respectivo LOD. Las aplicaciones prácticas han sido realizadas principalmente en muestras de sangre (humana y bovina), aunque hayan sido reportados dispositivos analíticos a los que han faltado aplicaciones en muestras reales. La única interferencia significativa ha sido encontrada para tres sensores, en dos de ellos ha sido debida a Fe^{3+} . Lo que comporta que también existen dispositivos analíticos capaces de determinar la Hb mediante otras metodologías con muy buena selectividad. Desde luego ¿cuáles son esas otras metodologías? Una explicación es necesaria, ya que se trata de la única diferencia significativa entre las dos categorías de dispositivos analíticos. Mientras los sensores basados en Cdots se basan en sus propiedades ópticas, principalmente la fluorimetría como se ha podido comprobar anteriormente, las metodologías para determinar la Hb sin el empleo de Cdots se basan también en medidas electroquímicas. Por lo tanto, se puede afirmar que la propuesta de un sensor luminiscente basado en Cdots para detección de la Hb y su implementación en un instrumento portátil llevada a cabo como parte integrante del trabajo de investigación descrito en la presente Tesis Doctoral cabe dentro de las metodologías analíticas de interés para la detección de ese biomarcador.

Tabla 4. Otras metodologías para detección de la Hb.

LOD y otros datos	Rango dinámico lineal	Aplicaciones	Interferencias significativas	Tipo medida	Ref.
$7,8 \times 10^{-11} \text{ mg L}^{-1}$; (S/N= 3,3).	$1,0 \times 10^{-10} - 1,0 \times 10^1 \text{ mg L}^{-1}$	Sangre bovina enriquecida	Ninguna	Electroquímica	[130]
$0,001 \text{ mg mL}^{-1}$	$0,005-1 \text{ mg mL}^{-1}$	Sangre humana	Ninguna	Electroquímica	[132]
$1,8 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ (BODIPY 4); $1,3 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ (BODIPY 5).	$1,8-250 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ (BODIPY 4); $1,3-100 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ (BODIPY 5).	Muestras de sangre humana (solas y enriquecidas)	Fe^{2+} y Fe^{3+}	Fluorimetría	[135]
$0,4 \text{ nM}$; RSD (%): 1,4.	$1-250 \text{ nM}$	Sangre	Ninguna	Fluorimetría	[137]
$0,03 \text{ } \mu\text{M}$	$0,1-20 \text{ } \mu\text{M}$	En disolución	Ninguna	Fluorimetría	[138]
$2,6 \times 10^{-10} \text{ M}$; RSD (%) = 3,9.	$1,0 \times 10^{-9} - 5,0 \times 10^{-6} \text{ M}$	En disolución	Ninguna	Electroquimioluminiscencia	[139]
$204,5 \text{ ng mL}^{-1}$	$0,01-0,5 \text{ mg mL}^{-1}$	Hb extraída de sangre de cerdo	Ninguna	Electroquímica	[140]
$6,7 \times 10^{-9} \text{ mg L}^{-1}$ (S/N = 3); RSD (%): 3,3-4,6.	$1,0 \times 10^{-8} - 1,0 \times 10^{-2} \text{ mg L}^{-1}$	Sangre bovina (muestras enriquecidas)	Ninguna	Electroquímica	[141]
RSD (%): 0,1-1,2	-	Sangre pura enriquecida con hemina bovina	-	Electroquímica	[142]
5 nM	-	En disolución y en sangre humana	Ninguna	Fluorimetría	[160]

Tabla 4. Otras metodologías para detección de la Hb (continuación).

LOD y otros datos	Rango dinámico lineal	Aplicaciones	Interferencias significativas	Tipo medida	Ref.
82 (\pm 4,2) nM; RSD (%): 3,1.	0,1-10 μ M	Sangre humana	Ninguna	Amperometría	[161]
-	1×10^{-4} - 1 mg mL ⁻¹	Sangre humana	-	Electroquímica	[162]
> 10 μ M	-	En disolución	-	Colorimetría	[163]
1,55 nM	15,5-620 nM	Sangre humana	Glucosa, EDTA, Br ⁻ , I ⁻ , Mg ²⁺ (a una concentración igual a la de Hb); CO ₃ ²⁻ , HCO ₃ ⁻ , Pb ²⁺ , C ₂ O ₄ ²⁻ (a una mitad de la concentración de Hb); Cys, Zn ²⁺ (a una concentración 10 veces inferior a la de Hb); Fe ³⁺ , Cu ²⁺ (a una concentración 500 veces inferior a la de Hb).	Colorimetría	[164]
0,64 nM	1-120 nM	Muestras microdializadas de cerebro de rata	Ninguna	Colorimetría	[165]
7,8 nM	25-3000 nM	Muestras bovinas de orina enriquecida	Ninguna	Fluorimetría	[166]
3 nM	9-540 nM	Sangre humana	Ninguna	Fluorimetría	[167]
2 nM	4-440 nM	Muestra de orina humana	Citocromo C, protoporfirina IX, mioglobina y hemo.	Fluorimetría	[168]
40,0 nM	50-4000 nM	En disolución	Ninguna	Fluorimetría	[169]

8.5. Sensor basado en Cdots y H₂O₂ para la determinación de la Hb en espectrómetro de luminiscencia: ventajas e inconvenientes

El sistema sensor basado en Cdots y H₂O₂ desarrollado para la determinación de la Hb en disolución mediante medidas de RTP en un espectrómetro de luminiscencia se basa en un mecanismo de atenuación de la RTP de los Cdots debido a la oxidación de los grupos hidroxilo de su superficie por las ROS, tales como radical hidroxilo y superóxido, generados tras la reacción entre Hb y H₂O₂ como descrito anteriormente con más detalles (ver subapartado 1.4). Ese sistema sensor, optimizado para la detección de Hb a pH 4 y un tiempo de reacción de 6 minutos, presenta varias ventajas. Su preparación resulta sencilla, el análisis rápido, pero aún más importante es que ese ha sido el único sensor fosforimétrico capaz de determinar la Hb debido a sus buenas características analíticas, tales como sensibilidad y reproducibilidad. Por ejemplo, ese sensor presenta un rango lineal más amplio con respecto a los otros sensores basados en Cdots reportados en la literatura [65, 133, 134, 143]. Sin embargo, ese sensor presenta algunos inconvenientes. Por ejemplo, el dispositivo analítico no ha sido ensayado en muestras reales, aunque la idea inicial era de hacerlo. Al contrario, en la literatura hay ejemplos de sensores basados en Cdots para detección de Hb en muestras reales. Otro inconveniente podría ser la falta de estudios de selectividad, aunque haya sido reportado que el efecto de muchos posibles interferentes en la detección de Hb mediante otro sensor basado en un mecanismo parecido haya sido desdeñable [65].

8.6. Sensor implementado en un instrumento portátil basado en Cdots y H₂O₂ para determinación de la Hb: ventajas e inconvenientes

La implementación del sensor para determinación de Hb en un instrumento portátil presenta varias ventajas. La más evidente es su uso para realizar medidas *in situ* sin necesidad de instrumentación compleja: el indispensable uso de un dispositivo electrónico (*smartphone*, *laptop* o incluso un ordenador de escritorio) para el procesamiento y tratamiento de los datos resulta un alivio comparado a la necesidad de un espectrómetro de luminiscencia. Desde el punto de vista analítico, ese dispositivo ha permitido aumentar la sensibilidad de las medidas de hasta tres grados de magnitud

comparado con el sensor basado en el método tradicional, o sea permite determinar Hb a concentraciones en el rango nanomolar.

Entonces, el LOD y el rango lineal caben dentro este intervalo de concentraciones, el más común para los sensores basados en Cdots y para algunos dispositivos analíticos que detectan Hb mediante otras metodologías [65, 133, 134, 137-139, 160, 161, 164-169]. Observando la función de calibrado, se puede constatar la óptima reproducibilidad del sistema sensor, que permite obtener diez medidas a la vez. Hay que destacar que, tal como el sistema sensor usado en el espectrómetro de luminiscencia, este sensor se basa en la fosforimetría, siendo el único capaz de detectar la Hb mediante medidas fosforimétricas. Mientras, los otros sensores basados en Cdots y algunos dispositivos analíticos basados en otras metodologías suelen detectar la Hb mediante fluorimetría [65, 133-135, 137, 138, 143, 160, 166-169]. Desde luego, ese sensor ha sido ensayado en muestras reales, por lo tanto se conocen las prestaciones de este sistema fosforimétrico en la determinación de la Hb, por ejemplo en muestras de sangre humana que es justamente donde se ha ensayado. Un estudio de mayor amplitud mostraría la utilidad de esta propuesta metodológica. Suponiendo que el sistema fuera selectivo, conforme a lo que ha sido reportado en estudios previos, se ha decidido obviar ulteriores estudios de selectividad también para el sistema sensor implementado en el instrumento portátil [65].

CONCLUSIONES

Conclusiones

Como resultado del trabajo realizado en esta Tesis Doctoral, se alcanzan las siguientes conclusiones:

- 1) Se han sintetizado y purificado diversos *carbon dots* (Cdots) utilizando distintas fuentes de carbono. Los Cdots se han caracterizado en cuanto a tamaño, forma y composición utilizando diversas técnicas espectroscópicas y de superficie,
- 2) Se han estudiado las características espectroscópicas de los Cdots, en concreto su absorción UV-Vis y luminiscente, demostrando que presentan emisión fluorescente y fosforescente. Esta última característica ha sido muy poco estudiada en Cdots y se ha utilizado como propiedad analítica en esta Tesis Doctoral.
- 3) Se ha estudiado la atenuación de la fosforescencia de los Cdots por metales pesados, en concreto Fe(III), Cu(II), Zn(II), Al(III) y Hg(II), y la influencia de diversas variables sobre esta atenuación.
- 4) Se ha diseñado un procedimiento fosforimétrico en disolución para la determinación de biotioles de tipo *turn-off* / *turn-on*, basado en la rápida atenuación (*turn-off*) de la fosforescencia de los Cdots mediante Hg(II) y su recuperación (*turn-on*) en presencia de los analitos. Estos biotioles presentan gran interés como biomarcadores de varias enfermedades.
- 5) Se ha estudiado el mecanismo de atenuación y recuperación de fosforescencia de los Cdots en presencia de los biotioles glutatión, L-cisteína y homocisteína.
- 6) Se han optimizado las variables de las diferentes reacciones involucradas, así la influencia del pH, el tiempo de reacción y la presencia de diversos potenciales interferentes, tales como aminoácidos y carbohidratos.
- 7) Estos procedimientos presentan buenas características analíticas, tales como reproducibilidad, sensibilidad y selectividad. Así, se alcanza un rango lineal significativo hasta una concentración 58 μM del analito L-cisteína (L-Cys) y un límite de detección (LOD) de 12,7 μM para el analito glutatión (GSH).
- 8) Se ha estudiado el uso de los Cdots sintetizados para la determinación de hemoglobina (Hb), analito clínico de gran interés. El procedimiento se basa en la

atenuación de fosforescencia de los Cdots en disolución en presencia de peróxido de hidrógeno y de hemoglobina.

- 9) Se ha estudiado el mecanismo de esta reacción. En un primer paso, la Hb reacciona con H_2O_2 generando especies reactivas de oxígeno (ROS), principalmente hidroxilo ($^{\circ}\text{OH}$) y radicales superóxido ($\text{O}_2^{\circ-}$). La posterior oxidación de los grupos hidroxilo de la superficie de los Cdots por los radicales hidroxilos generados en disolución modifica la estructura de la superficie, lo que lleva a una atenuación de la luminiscencia de los Cdots.
- 10) Tras optimizar las variables que influyen en la reacción, ha sido propuesto un método de determinación de hemoglobina con buenas características analíticas.
- 11) El método analítico fosforimétrico puesto a punto para hemoglobina ha sido implementado en un instrumento portátil de diseño propio para la medida tanto de la intensidad como del tiempo de vida de la fosforescencia.
- 12) El problema que presentan los Cdots como reactivo analítico es que son un material y no un compuesto químico definido. Esto significa que la variabilidad que pueden presentar de un lote de síntesis a otro obligaría a una calibración frecuente; problema más acuciante si se trata de usar una instrumentación portátil. Se ha abordado el problema en esta Tesis Doctoral desarrollando un instrumento portátil basado en electrónica reconfigurable, que hace posible adaptar el dispositivo instrumental a la variabilidad inherente en la respuesta óptica de los Cdots procedentes de diferentes síntesis.
- 13) Con esta finalidad se ha diseñado y desarrollado un instrumento portátil con capacidad de transmisión inalámbrica para la determinación de hemoglobina utilizando un análisis en el dominio de tiempo para obtener tanto la intensidad de fosforescencia como la vida útil de un decaimiento exponencial de la luminiscencia, evitando el uso de instrumentación rápida o componentes electrónicos de alto rendimiento.
- 14) El instrumento portátil ha permitido una mejora significativa en la sensibilidad y reproducibilidad del sistema sensor. Así, se ha alcanzado un límite de detección de 6,2 nM, llegando el rango lineal hasta una concentración de 125 nM.

- 15) Se ha desarrollado una aplicación para teléfono móvil capaz de recibir las señales generadas por el instrumento portátil y calcular la concentración de hemoglobina. Por último, se ha aplicado el procedimiento a la determinación de hemoglobina en sangre procedente de dos voluntarios sanos.

Conclusiones

REFERENCIAS

Referencias

Esta parte final de la presente Tesis Doctoral está dedicada a las referencias bibliográficas que han sido consultadas para contrastar o comprender los conceptos que están a la base de la investigación sobre síntesis y caracterización de nanopartículas de carbono luminiscentes para su uso en (bio) sensores, descrita en esa memoria de Tesis Doctoral. Las citas bibliográficas están ordenadas en orden de aparición en el texto.

- [1] M. Marazuela, M. Moreno-Bondi, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2002**, 372, 664-682.
- [2] R. Narayanaswamy, O. S. Wolfbeis, *Optical sensors. Industrial, environmental and diagnostic applications*, **2004**, 1st Ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.
- [3] E. Di Zitti, D. Ricci, D. D. Caviglia, *Mondo Digitale*, **2004**, 3, 3-20.
- [4] C. Sanchez, P. Belleville, M. Popall, L. Nicole, *Chemical Society Reviews*, **2011**, 40, 696-753.
- [5] S. Majumdar, U. Baruah, G. Majumdar, D. Thakur, D. Chowdhury, *RSC Advances*, **2016**, 6, 57327-57333.
- [6] M. Valcárcel, B. M. Simonet, S. Cárdenas, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2008**, 391, 1881-1887.
- [7] M. Valcárcel, B. M. Simonet, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2011**, 399, 1-2.
- [8] R. E. Bailey, A. M. Smith, S. Nie, *Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures*, **2004**, 25, 1-12.
- [9] J. Lu, S. Ge, L. Ge, M. Yan, J. Yu, *Electrochimica Acta*, **2012**, 80, 334-341.
- [10] Y. Shi, Y. Pan, H. Zhang, Z. Zhang, M. J. Li, C. Yi, M. Yang, *Biosensors and Bioelectronics*, **2014**, 56, 39-45.
- [11] J. Pishahang, H. Barzegar Amiri, H. Helid, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2018**, 256, 878-887.

Referencias

- [12] A. Barati, M. Shamsipur, H. Abdollahi, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2016**, 289-297.
- [13] Z. Li, Y. Wang, Y. Ni, S. Kokot, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2015**, 207, 490-497.
- [14] X. Ran, Q. Qu, X. Qian, W. Xie, S. Li, L. Li, L. Yang, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2018**, 257, 362-371.
- [15] L. Li, C. Zeng, L. Ai, J. Jiang, *Journal of Alloys and Compounds*, **2015**, 639, 470-477.
- [16] J. Ju, R. Zhang, W. Chen, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2016**, 228, 66-73.
- [17] O. Antoine, Y. Bultel, R. Durand, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **2001**, 499, 85-94.
- [18] L. Guo, Q. Huang, X. Li, S. Yang, *Physical Chemistry Chemical Physics*, **2001**, 3, 1661-1665.
- [19] P. C. Biswas, Y. Nodasaka, M. Enyo, M. Haruta, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **1995**, 381, 167-177.
- [20] G. K. Vertelov, A. Y. Olenin, G. V. Lisichkin, *Journal of Analytical Chemistry*, **2007**, 62, 813-824.
- [21] M. S. Celej, G. Rivas, *Electroanalysis*, **1998**, 10, 771-775.
- [22] C. R. Raj, T. Okajima, T. Ohsaka, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **2003**, 543, 127-133.
- [23] D. Fernández Rivas, *Revista Cubana de Física*, **2001**, 28,60-67.
- [24] P. Milani, P. Piseri, E. Barborini, *Le scienze*, **2000**, 115, 76-78.
- [25] V. Balzani, A. Credi, M. Venturi, *Physics World*, **2004**, 17, 39-43.
- [26] M. Shamsipur, A. Safavi, Z. Mohammadpour, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2014**, 199, 463-469.

- [27] M. Amjadi, Z. Abolghasemi-Fakhri, T. Hallaj, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, **2015**, 309, 8-14.
- [28] Q. Y. Cai, J. Li, J. Ge, L. Zhang, Y. L. Hu, Z. H. Li, L. B. Qu, *Biosensors and Bioelectronics*, **2015**, 72, 31-36.
- [29] J. Pan, Z. Zheng, J. Yang, Y. Wu, F. Lu, Y. Chen, W. Gao, *Talanta*, **2017**, 166, 1-7.
- [30] H. Lu, S. Xu, *Biosensors and Bioelectronics*, **2017**, 92, 147-153.
- [31] M. Chirea, C. M. Pereira, F. Silva, *The Journal of Physical Chemistry C*, **2007**, 111, 9255-9266.
- [32] Z. Zhang, Z. Zhang, H. Liu, X. Mao, W. Liu, S. Zhang, Z. Nie, X. Lu, *Biosensors and Bioelectronics*, **2018**, 103, 87-93.
- [33] D. Hernández-Santos, M. B. González-García, A. C. García, *Electroanalysis*, **2002**, 14, 1225-1235.
- [34] Y. Xiao, H. X. Ju, H. Y. Chen, *Analytica Chimica Acta*, **1999**, 391, 73-82.
- [35] G. Sun, P. Wang, S. Ge, L. Ge, J. Yu, M. Yan, *Biosensors and Bioelectronics*, **2014**, 56, 97-103.
- [36] H. Li, X. Yan, G. Lu, X. Su, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2018**, 260, 563-570.
- [37] X. Tian, H. Peng, Y. Li, C. Yang, Z. Zhou, Y. Wang, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2017**, 243, 1002-1009.
- [38] Y. Sameenoi, P. N. Nongkai, S. Nouanthavong, C. S. Henry, D. Nacapricha, *Analyst*, **2014**, 139, 6580-6588.
- [39] J. Zhang, S. H. Yu, *Nanoscale*, **2014**, 6, 4096-4101.
- [40] L. A. A. Chunduri, M. K. Haleyurgirisetty, S. Patnaik, P. E. Bulagonda, A. Kurdekar, J. Liu, I. K. Hewlett, V. Kamiseti, *Microfluidics and Nanofluidics*, **2016**, 20, 167.

Referencias

- [41] Q. Jin, Y. Li, J. Huo, X. Zhao, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2016**, 227, 108-116.
- [42] Y. Liu, X. Gong, Y. Gao, S. Song, X. Wu, S. Shuang, C. Dong, *RSC Advances*, **2016**, 6, 28477-28483.
- [43] J. Hou, F. Zhang, X. Yan, L. Wang, J. Yan, H. Ding, L. Ding, *Analytica Chimica Acta*, **2015**, 859, 72-78.
- [44] Y. Wang, Y. Zhao, F. Zhang, L. Chen, Y. Yang, X. Liu, *New Journal of Chemistry*, **2016**, 40, 8710-8716.
- [45] C. Fu, K. Qian, A. Fu, *Materials Science and Engineering: C*, **2017**, 76, 350-355.
- [46] J. Kudr, L. Richtera, K. Xhaxhiu, D. Hynek, Z. Heger, O. Zitka, V. Adam, *Biosensors and Bioelectronics*, **2017**, 92, 133-139.
- [47] L. Lin, X. Song, Y. Chen, M. Rong, Y. Wang, L. Zhao, T. Zhao, X. Chen, *Analytica Chimica Acta*, **2015**, 891, 261-268.
- [48] F. Yan, D. Shi, T. Zheng, K. Yun, X. Zhou, L. Chen, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2016**, 224, 926-935.
- [49] Z. Wu, W. Li, J. Chen, C. Yu, *Talanta*, **2014**, 119, 538-543.
- [50] F. Li, C. Liu, J. Yang, Z. Wang, W. Liu, F. Tian, *RSC Advances*, 2014, **4**, 3201-3205.
- [51] J. He, H. Zhang, J. Zou, Y. Liu, J. Zhuang, Y. Xiao, B. Lei, *Biosensors and Bioelectronics*, **2016**, 79, 531-535.
- [52] T. Liu, N. Li, J. X. Dong, H. Q. Luo, N. B. Li, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2016**, 231, 147-153.
- [53] R. Gui, H. Jin, Y. Wang, J. Sun, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2017**, 245, 386-394.
- [54] P. Das, S. Ganguly, M. Bose, S. Mondal, A. K. Das, S. Banerjee, N. C. Das, *Materials Science and Engineering: C*, **2017**, 75, 1456-1464.

- [55] Y. Zhou, A. Desserre, S. K. Sharma, S. Li, M. H. Marksberry, C. Chusuei, P. L. Blackwelder, R. M. Leblanc, *ChemPhysChem*, **2017**, 18, 890-897.
- [56] S. Dolai, S. K. Bhunia, L. Zeiri, O. Paz-Tal, R. Jelinek, *ACS Omega*, **2017**, 2, 9288-9295.
- [57] B. Zhi, M. J. Gallagher, B. P. Frank, T. Y. Lyons, T. A. Qiu, J. Da, A. C. Mensch, R. J. Hamers, Z. Rosenzweig, D. H. Fairbrother, C. L. Haynes, *Carbon*, **2018**, 129, 438-449.
- [58] A. A. Ensafi, P. Nasr-Esfahani, B. Rezaei, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2018**, 257, 889-896.
- [59] J. Jana, T. Aditya, M. Ganguly, T. Pal, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2017**, 246, 716-725.
- [60] F. Wang, P. Chen, Y. Feng, Z. Xie, Y. Liu, Y. Su, Q. Zhang, Y. Wang, K. Yao, W. Lu, G. Liu, *Applied Catalysis B: Environmental*, **2017**, 207, 103-113.
- [61] R. Mohan, J. Drbohlavova, J. Hubalek, *Chemical Physics Letters*, **2018**, 692, 196-201.
- [62] N. Massad-Ivanir, S. Kumar-Bhunia, N. Raz, E. Segal, R. Jelinek, *NPG Asia Materials*, **2018**, 10, 1-9.
- [63] S. Mandani, B. Sharma, D. Dey, T. K. Sarma, *Nanoscale*, **2015**, 7, 1802-1808.
- [64] L. Lu, C. Feng, J. Xu, F. Wang, H. Yu, Z. Xu, W. Zhang, *Biosensors and Bioelectronics*, **2017**, 92, 101-108.
- [65] A. Barati, M. Shamsipur, H. Abdollahi, *Biosensors and Bioelectronics*, **2015**, 71, 470-475.
- [66] S. Zou, C. Hou, H. Fa, L. Zhang, Y. Ma, L. Dong, D. Lia, D. Hu, M. Yang, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2017**, 239, 1033-1041.
- [67] Y. Zhang, L. Hu, Y. Sun, C. Zhu, R. Li, N. Liu, H. Huang, *RSC Advances*, **2016**, 6, 59956-59960.

Referencias

- [68] Z. Song, F. Quan, Y. Xu, M. Liu, L. Cui, J. Liu, *Carbon*, **2016**, 104, 169-178.
- [69] X. Liu, X. Hu, Z. Xie, P. Chen, X. Sun, J. Yan, S. Zhou, *Analytical Methods*, **2016**, 8, 3236-3241.
- [70] Y. Guo, L. Yang, W. Li, X. Wang, Y. Shang, B. Li, *Microchimica Acta*, **2016**, 183, 1409-1416.
- [71] J. Y. Wan, Z. Yang, Z. G. Liu, H. X. Wang, *RSC Advances*, **2016**, 6, 61292-61300.
- [72] R. Atchudan, T. N. J. I. Edison, D. Chakradhar, S. Perumal, J. J. Shim, Y. R. Lee, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2017**, 246, 497-509.
- [73] X. Wu, Y. Song, X. Yan, C. Zhu, Y. Ma, D. Du, Y. Lin, *Biosensors and Bioelectronics*, **2017**, 94, 292-297.
- [74] J. Xu, X. Jie, F. Xie, H. Yang, W. Wei, Z. Xia, *Nano Research*, **2018**, 11, 3648-3657.
- [75] S. M. Y. Mohamed Mukthar Ali, K. Y. Sandhya, *ChemistrySelect*, **2017**, 2, 11840-11845.
- [76] S. Liao, F. Zhu, X. Zhao, H. Yang, X. Chen, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2018**, 260, 156-164.
- [77] K. Chen, W. Zhang, Y. Zhang, L. Huang, R. Wang, X. Yue, W. Zhu, D. Zhang, X. Zhang, Y. Zhang, J. Wang, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2018**, 259, 717-724.
- [78] J. Gu, D. Hu, W. Wang, Q. Zhang, Z. Meng, X. Jia, K. Xi, *Biosensors and Bioelectronics*, **2015**, 68, 27-33.
- [79] L. Shi, J. H. Yang, H. B. Zeng, Y. M. Chen, S. C. Yang, C. Wu, *Nanoscale*, **2016**, 8, 14374-14378.
- [80] Y. Zhang, P. Cui, F. Zhang, X. Feng, Y. Wang, Y. Yang, X. Liu, *Talanta*, **2016**, 152, 288-300.

- [81] H. Li, Z. Kang, Y. Liu, S. T. Lee, *Journal of Materials Chemistry*, **2012**, 22, 24230-24253.
- [82] F. Lin, W. N. He, X. Q. Guo, *Advanced Materials Research*, **2012**, 415-417, 1319-1322.
- [83] J. M. Liu, L. Lin, X. X. Wang, S. Q. Lin, W. L. Cai, L. H. Zhang, *Analyst*, **2012**, 137, 2637-2642.
- [84] A. Salinas-Castillo, M. Ariza-Avidad, C. Pritz, M. Camprubí-Robles, B. Fernández, M. J. Ruedas-Rama, A. Megia-Fernández, A. Lapresta-Fernández, F. Santoyo-Gonzalez, A. Schrott-Fischer, L. F. Capitan-Vallvey, *Chemical Communications*, **2013**, 49, 1103-1105.
- [85] Y. Hiejima, M. Kanakubo, *Journal of Solution Chemistry*, **2016**, 45, 1560-1570.
- [86] W. Liu, C. Li, X. Sun, W. Pan, J. Wang, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2017**, 244, 441-449.
- [87] S. Chandra, T. K. Mahto, A. R. Chowdhuri, B. Das, S. K. Sahu, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2017**, 245, 835-844.
- [88] G. Chen, F. Song, X. Xiong, X. Peng, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **2013**, 52, 11228-11245.
- [89] J. L. Ward, G. L. Walden, J. D. Winefordner, *Talanta*, **1981**, 28, 201-206.
- [90] C. Hou, S. Chen, M. Wang, *Dalton Transactions*, **2018**, 47, 1777-1781.
- [91] L. M. Shen, Q. Chen, Z. Y. Sun, X. W. Chen, J. H. Wang, *Analytical Chemistry*, **2014**, 86, 5002-5008.
- [92] S. Zhao, C. Li, L. Wang, N. Liu, S. Qiao, B. Liu, H. Hui, Y. Liu, Z. Kang, *Carbon*, **2016**, 99, 599-606.
- [93] L. Qiao, T. Sun, X. Zheng, M. Zheng, Z. Xie, *Materials Science & Engineering C*, **2018**, 85, 1-6.

Referencias

- [94] Y. Huang, J. Zhou, H. Feng, J. Zheng, H. M. Ma, W. Liu, C. Tang, H. Ao, M. Zhao, Z. Qian, *Biosensors and Bioelectronics*, **2016**, 86, 748-755.
- [95] K. Hola, Y. Zhang, Y. Wang, E. P. Giannelis, R. Zboril, A. L. Rogach, *Nano Today*, **2014**, 9, 590-603.
- [96] Y. Li, X. Zheng, X. Zhang, S. Liu, Q. Pei, M. Zheng, Z. Xie, *Advanced Healthcare Materials*, **2017**, 6, 1600924.
- [97] D. W. Zheng, B. Li, C. X. Li, J. X. Fan, Q. Lei, C. Li, Z. Xu, X. Z. Zhang, *ACS Nano*, **2016**, 10, 8715-8722.
- [98] M. Lan, S. Zhao, Z. Zhang, L. Yan, L. Guo, G. Niu, J. Zhang, *Nano Research*, **2017**, 10, 3113-3123.
- [99] M. Zheng, Y. Li, S. Liu, W. Wang, Z. Xie, X. Jing, *ACS Applied Materials & Interfaces*, **2016**, 8, 23533-23541.
- [100] X. Peng, R. Wang, T. Wang, W. Yang, H. Wang, W. Gu, L. Ye, *ACS Applied Materials & Interfaces*, **2018**, 10, 1084-1092.
- [101] F. A. Permatasari, H. Fukazawa, T. Ogi, F. Iskandar, K. Okuyama, *ACS Applied Nano Materials*, **2018**, 1, 2368-2375.
- [102] Q. Zeng, D. Shao, X. He, Z. Ren, W. Ji, C. Shan, *Journal of Materials Chemistry B*, **2016**, 4, 5119-5126.
- [103] A. Sachdev, I. Matai, P. Gopinath, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **2016**, 141, 242-252.
- [104] Q. Wang, C. Zhang, G. Shen, H. Liu, H. Fu, D. Cui, *Journal of Nanobiotechnology*, **2014**, 12:58.
- [105] H. Liu, Q. Wang, G. Shen, C. Zhang, C. Li, W. Ji, *Nanoscale Research Letters*, **2014**, 9:397.
- [106] J. S. Sidhu, A. Singh, N. Garg, N. Kaur, N. Singh, *Analyst*, **2018**, 143, 1853-1861.
- [107] A. Gupta, C. K. Nandi, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2017**, 245, 137-145.

- [108] Y. Dong, J. Cai, Q. Fang, X. You, Y. Chi, *Analytical Chemistry*, **2016**, 88, 1748-1752.
- [109] C. Liu, Y. Fu, Y. Xia, C. Zhu, L. Hu, K. Zhang, H. Wu, *Nanoscale*, **2018**, 10, 2454-2460.
- [110] A. T. R. Williams, S. A. Winfield, J. N. Miller, *Analyst*, **1983**, 108, 1067-1071.
- [111] D. M. Alzate, R. Rodríguez, C. A. Sierra, *Revista Colombiana de Química*, **2010**, 39, 309-313.
- [112] R. J. Hurtubise, *Phosphorimetry: Theory, Instrumentation and Applications*, **1990**, 1st Ed., Wiley VCH: New York, Print.
- [113] Z. Li, Y. Zhang, Q. Niu, M. Mou, Y. Wu, X. Liu, Z. Yan, *Journal of Luminescence*, **2017**, 274-280.
- [114] G. Ren, Q. Zhang, S. Li, S. Fu, F. Chai, C. Wang, F. Qu, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2017**, 243, 244-253.
- [115] S. Xu, Y. Liu, H. Yang, K. Zhao, J. Li, A. Deng, *Analytica Chimica Acta*, **2017**, 964, 150-160.
- [116] Y. Xu, X. Chen, R. Chai, C. Xing, H. Li, X. B. Yin, *Nanoscale*, **2016**, 8, 13414-13421.
- [117] A. Gupta, A. Chaudhary, P. Mehta, C. Dwivedi, S. Khan, N. C. Verma, C. K. Nandi, *Chemical Communications*, **2015**, 51, 10750-10753.
- [118] Q. Wang, X. Liu, L. Zhang, Y. Lv, *Analyst*, **2012**, 137, 5392-5397.
- [119] Y. Wang, K. Jiang, J. Zhu, L. Zhang, H. Lin, *Chemical Communication*, **2015**, 51, 12748-12751.
- [120] C. Yang, W. Deng, H. Liu, S. Ge, M. Yan, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2015**, 216, 286-292.
- [121] K. Jiang, S. Sun, L. Zhang, Y. Wang, C. Cai, *ACS Applied Materials & Interfaces*, **2015**, 7, 23231-23238.

Referencias

- [122] H. Fu, Z. Ji, X. Chen, A. Cheng, S. Liu, P. Gong, G. Li, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2017**, 409, 2373-2382.
- [123] S. Lu, D. Wu, G. Li, Z. Lv, Z. Chen, L. Chen, G. Chen, L. Xia, J. You, Y. Wu, *RSC Advances*, **2016**, 6, 103169-103177.
- [124] Q. Lu, H. Wang, Y. Liu, Y. Hou, H. Li, Y. Zhang, *Biosensors and Bioelectronics*, **2017**, 89, 411-416.
- [125] K. Das, S. Sarkar, P. K. Das, *ACS Applied Materials & Interfaces*, **2016**, 8, 25691-25701.
- [126] Q. H. Li, L. Zhang, J. M. Bai, Z. C. Liu, R. P. Liang, J. D. Qiu, *Biosensors and Bioelectronics*, **2015**, 74, 886-894.
- [127] Z. Zhu, W. Liu, L. Cheng, Z. Li, Z. Xi, L. Yi, *Tetrahedron Letters*, **2015**, 56, 3909-3912.
- [128] Y. Mena, Z. Li, J. Zhang, Z. Tong, Z. Xi, X. Qiu, L. Yi, *Tetrahedron Letters*, **2015**, 56, 5781-5786.
- [129] Z. X. Wang, F. Y. Kong, W. Wang, *Chemistry - A European Journal*, **2017**, 23, 665.
- [130] Y. Sun, H. Du, Y. Lan, W. Wang, Y. Liang, C. Feng, M. Yang, *Biosensors and Bioelectronics*, **2016**, 77, 894-900.
- [131] G. Mohanty, B. K. Sahoo, *Current Applied Physics*, **2016**, 16, 1607-1613.
- [132] B. Sun, X. Ni, Y. Cao, G. Cao, *Biosensors and Bioelectronics*, **2017**, 91, 354-358.
- [133] S. Huang, L. Wang, C. Huang, J. Xie, W. Su, J. Sheng, Q. Xiao, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2015**, 221, 1215-1222.
- [134] F. Qu, D. Liu, J. You, *Analytica Chimica Acta*, **2016**, 921, 59-66.
- [135] E. Okutan, S. O. Tümay, S. Yeşilot, *Journal of Fluorescence*, **2016**, 26, 2333-2343.

- [136] Y. Cao, L. Zhang, X. Huang, Y. Xin, L. Ding, *ACS Applied Materials & Interfaces*, **2016**, 8, 35650-35659.
- [137] D. Yang, H. Meng, Y. Tu, J. Yan, *Talanta*, **2017**, 170, 233-237.
- [138] H. Li, X. Wei, Y. Zhang, Y. Xu, K. Lu, C. Li, Y. Yan, *Journal of Alloys and Compounds*, **2016**, 685, 820-827.
- [139] K. Y. Yi, C. S. Wei, *International Journal of Electrochemical Science*, **2017**, 12, 3472-3482.
- [140] C. Li, J. Li, H. Tang, X. Yang, Q. Fei, C. Sun, *Analytical Methods*, **2017**, 9, 1265-1272.
- [141] Y. Sun, Y. Lan, L. Yang, F. Kong, H. Du, C. Feng, *RSC Advances*, **2016**, 6, 61897-61905.
- [142] V. Kumar, D. M. Nikhila Kashyap, S. Hebbar, R. Swetha, S. Prasad, T. Kamala, S. S. Srikanta, P. R. Krishnaswamy, N. Bhat, *Scientific Reports - Nature*, **2017**, 7, 1-7.
- [143] P. J. S. Rana, P. Singh, P. Kar, *RSC Advances*, **2016**, 6, 70660-70668.
- [144] J. Li, B. Wang, H. Zhang, J. Yu, *Small*, **2019**, 15, 1805504.
- [145] T. H. Ulep, J. Y Yoon, *Nano Convergence*, **2018**, 5, 1-11.
- [146] X. Huang, D. Xu, J. Chen, J. Liu, Y. Li, J. Song, X. Ma, J. Guo, *Analyst*, **2018**, 143, 5339-5351.
- [147] S. Silvi, A. Credi, *Chemical Society Reviews*, **2015**, 44, 4275-4289.
- [148] C. McDonagh, C. S. Burke, B. D. MacCraith, *Chemical Reviews*, **2008**, 108, 400-422.
- [149] R. Franke, G. Holst, *Frequency-domain fluorescence lifetime imaging system (pco.flim) based on a in-pixel dual tap control CMOS image sensor*, **2015**, SPIE: Vol. 9328.

Referencias

- [150] H. Chen, G. Holst, E. Gratton, *Microscopy Research and Technique*, **2015**, 78, 1075-1081.
- [151] G. Fu, S. R. Sonkusale, *IEEE Transaction on Biomedical Circuits and Systems*, **2018**, 12, 677-688.
- [152] D. E. Schwartz, E. Charbon, K. L. Shepard, *IEEE Journal of Solid-state Circuits*, **2008**, 43, 2546-2557.
- [153] P. Kassal, M. D. Steinberg, I. M. Steinberg, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2018**, 266, 228-245.
- [154] N. López-Ruiz, D. Hernández-Bélanger, M. A. Carvajal, L. F. Capitán-Vallvey, A. J. Palma, A. Martínez-Olmos, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2015**, 216, 595-602.
- [155] E. De los Reyes-Berbel, I. Ortiz-Gomez, M. Ortega-Muñoz, A. Salinas-Castillo, L. F. Capitan-Vallvey, F. Hernandez-Mateo, F. J. Lopez-Jaramillo, F. Santoyo-Gonzalez, *Nanoscale*, **2020**.
- [156] S. Lakard, G. Herlem, B. Lakard, B. Fahys, *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, **2004**, 685, 83-87.
- [157] X. Yan, J. L. Chen, M. X. Su, F. Yan, B. Li, B. Di, *RSC Advances*, **2014**, 4, 22318-22323.
- [158] L. Shang, S. Dong, *Analytical Chemistry*, **2009**, 81, 1465-1470.
- [159] X. Sun, Y. Lei, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **2017**, 89, 163-180.
- [160] F. Lu, H. Yang, Z. Yuan, T. Nakanishi, C. Lu, Y. He, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2019**, 291, 170-176.
- [161] J. M. Moon, D. M. Kim, M. H. Kim, J. Y. Han, D. K. Jung, Y. B. Shim, *Biosensors and Bioelectronics*, **2017**, 91, 128-135.
- [162] D. H. Kuan, I. S. Wang, J. R. Lin, C. H. Yang, C. H. Huang, Y. H. Lin, C. T. Lin, N. T. Huang, *Lab on a Chip*, **2016**, 16, 3105-3113.

- [163] J. L. Rogowski, M. S. Verma, P. Z. Chen, F. X. Gu, *Analyst*, **2016**, 141, 5627-5636.
- [164] N. Pourreza, H. Golmohammadi, *RSC Advances*, **2015**, 5, 1712-1717.
- [165] R. Li, Q. Jiang, H. Cheng, G. Zhang, M. Zhen, D. Chen, J. Ge, L. Mao, C. Wang, C. Shu, *Analyst*, **2014**, 139, 1993-1999.
- [166] Q. Yang, J. Li, X. Wang, H. Xiong, L. Chen, *Analytical Chemistry*, **2019**, 91, 6561-6568.
- [167] A. V. Yegorova, I. I. Leonenko, D. I. Aleksandrova, Y. V. Scrypynets, V. P. Antonovich, I. V. Ukrainets, *Journal of Applied Spectroscopy*, **2014**, 81, 672-677.
- [168] Q. Wang, G. Zhan, C. Li, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **2014**, 117, 198-203.
- [169] Q. Li, K. Peng, Y. Yu, X. Ruan, Y. Wei, *Electrophoresis*, **2019**, 40, 2129-2134.

Referencias

ANEXOS

Por último, pero no menos importante, se ha decidido incluir en la presente Tesis Doctoral tres anexos.

El primero (Anexo I) es un artículo, concretamente la publicación original de la que el Doctorando es el primer autor y que incluye parte de los resultados de la Tesis Doctoral. Por lo tanto, es lógico incluirlo como anexo a la misma, en formato electrónico (PDF), tal como se puede consultar por la red desde el día 26 de abril de 2020.

Mientras, el segundo anexo (Anexo II) es otro artículo, publicado en la misma revista dónde se publicó el Anexo I, del que el susodicho Doctorando no es el autor principal, sino coautor. Por cuestiones de normativa, ese artículo se va a presentar en forma de manuscrito, tal como ha sido enviado a la revista para su publicación.

Asimismo, el tercer anexo (Anexo III) se va a presentar en su formato original, que como los dos primeros difiere del que se ha decidido adoptar para la redacción de la presente Tesis Doctoral, y también por esa razón van como anexos a la misma. El Anexo III se refiere al Documento de Actividades del Doctorando, que refleja las actividades a las que el Doctorando ha participado, tales como conferencias, cursos, congresos y redacción como primer autor de un artículo científico en un medio de impacto contrastado.

Para que conste:

<i>Anexo I: Portable Instrument for Hemoglobin Determination Using Room-Temperature Phosphorescent Carbon Dots.....</i>	213
<i>Anexo II: Carbon dots as sensing layer for printed humidity and temperature sensors</i>	227
<i>Anexo III: Documento de Actividades del Doctorando</i>	237



Article

Portable Instrument for Hemoglobin Determination Using Room-Temperature Phosphorescent Carbon Dots

Fabio Murru ¹, Francisco J. Romero ² , Roberto Sánchez-Mudarra ², Francisco J. García Ruiz ² , Diego P. Morales ^{2,3,4} , Luis Fermín Capitán-Vallvey ^{1,3,4} and Alfonso Salinas-Castillo ^{1,3,4,*}

¹ Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Granada, 18071 Granada, Spain; fmurru@correo.ugr.es (F.M.); lcapitan@ugr.es (L.F.C.-V.)

² Department of Electronics and Computer Technology, Faculty of Sciences, University of Granada, 18071 Granada, Spain; franromero@ugr.es (F.J.R.); rcs86@gmail.com (R.S.-M.); franruiz@ugr.es (F.J.G.R.); diegopm@ugr.es (D.P.M.)

³ ECsens Group, University of Granada, 18071 Granada, Spain

⁴ Unit of Excellence in Chemistry Applied to Biomedicine and the Environment, University of Granada, 18071 Granada, Spain

* Correspondence: alfonsos@ugr.es; Tel.: +34-958-248-436

Received: 30 March 2020; Accepted: 24 April 2020; Published: 26 April 2020



Abstract: A portable reconfigurable platform for hemoglobin determination based on inner filter quenching of room-temperature phosphorescent carbon dots (CDs) in the presence of H₂O₂ is described. The electronic setup consists of a light-emitting diode (LED) as the carbon dot optical exciter and a photodiode as a light-to-current converter integrated in the same instrument. The reconfigurable feature provides adaptability to use the platform as an analytical probe for CDs coming from different batches with some variations in luminescence characteristics. The variables of the reaction were optimized, such as pH, concentration of reagents, and response time; as well as the variables of the portable device, such as LED voltage, photodiode sensitivity, and adjustment of the measuring range by a reconfigurable electronic system. The portable device allowed the determination of hemoglobin with good sensitivity, with a detection limit of 6.2 nM and range up to 125 nM.

Keywords: carbon dots; hemoglobin determination; luminescence; room temperature phosphorescence; portable instrumentation

1. Introduction

In recent years, optical chemical sensing has been a growing research area in many scientific fields as an alternative to expensive and complex conventional analytical procedures [1]. These sensors are based on the monitoring of different optical parameters to obtain the analyte information, such as absorption [2], luminescence intensity [3], luminescence lifetime [3,4], or refractive index [5]. Luminescence-based sensors are highly interesting due to their sensitivity and simplicity, sometimes in combination with smartphones, resulting in portable devices [6,7]. In addition, detection by phosphorescence at room temperature (RTP) offers several advantages over fluorescence, including improved selectivity, a lower emission lifetime, and elimination of spectral interferences from light scattering or autofluorescence.

The present study focuses on the use of the intensity and lifetime of RTP, which allows a sensitive, fast, and reliable determination of the analyte concentration [8,9]. Different methods exist to obtain the decay rate of the excited state, which is a measure of luminescence lifetime, some based on frequency domain analyses, which require costly instrumentation or complex signal processing steps, such as that proposed by Franke et al. [10] or Chen et al. [11]. Others follow direct time-domain

techniques, which, in most cases, require high-speed complex readout circuits due to their short lifetimes [12,13]. However, these solutions disrupt the current trend of wireless chemical sensors (WCS), which, within the Internet of Things (IoT) paradigm, aims to make ubiquitous analytical bio-chemical sensing a reality [14]. This paper presents the development and validation of a WCS that uses room-temperature phosphorescence determination of bio-analytes, hemoglobin in this particular case, based on a windows-based algorithm implemented in a reconfigurable device [15].

Hemoglobin (Hb) is a protein that plays a vital role in transporting molecular oxygen through the blood from the respiratory organs (lungs or gills) to the various parts of the body and, in turn, the main portion of CO₂ from the different organs of the body to the respiratory organs. Hb is a tetrameric metalloprotein that has a quaternary structure composed of four globular protein subunits, each of which contains a non-protein heme group with an iron atom in the ferrous state chelated to four rings of protoporphyrin. Currently, the measurement of Hb plays a crucial role in identifying diseases such as anemia (low Hb level) and polycythemia (high Hb level). The Hb test is also very important during pregnancy, since these diseases are associated with an increased risk of premature birth. Different procedures have been proposed for Hb determination in clinical diagnosis such as optical [16,17], electrochemical [18], or liquid chromatography [19]. A widely used method is the spectrophotometric procedure based on the Van Kampen–Zijlstra reagent, although it uses the toxic alkaline cyanide as a reagent among other disadvantages [20]. Several carbon dot (CD) fluorescent sensors for Hb determination have been published in recent years [21,22]. Therefore, easy, environmentally friendly, and precise assays for the quantitative analysis of Hb is of interest for clinical and physiological diagnosis.

Among the current luminescent nanoparticles (NPs) used in these kind of applications, novel CDs have attracted the interest of many researchers due to their unique properties such as tunable photoluminescence, wavelength-dependency excitation, good photostability, water solubility, low toxic effects, and biocompatibility [23,24]. These properties, together with the CDs' ability to interact with analytes causing a luminescence quenching, makes CDs a perfect candidate for analyte and bio-analyte determination [3,15,25]. Recently, the phenomenon of phosphorescence at room temperature has been described in both solutions and solid state for CDs [26].

Nevertheless, the variability in the optical properties in every batch synthesis of CDs is one of the limiting factors, when using them is considered for portable instruments, since it would involve multiple calibration steps, firmware updates, or even hardware changes. To overcome these limitations, we considered the use of reconfigurable electronics, which makes it possible to adapt the WCS to the inherent variability in the optical response of different batch syntheses. The feasibility of this approach has been successfully demonstrated for diverse analog sensing applications, such as temperature monitoring and electrochemiluminescent determination [27,28]. To that end, we present a portable instrument with wireless transmission capability for Hb determination using a time domain analysis to obtain both phosphorescence intensity and the lifetime of a luminescence exponential decay, avoiding the use of fast instrumentation or high-performance electronics components.

2. Materials and Methods

2.1. Reagents and Materials

All the chemicals used in this study were of analytical quality and were used without further purification. Anhydrous citric acid, sodium hydrogen phosphate, sodium hydroxide, and hydrochloric acid were purchased from Panreac Química SLU (Barcelona, Spain). Sodium dihydrogen phosphate, ethylenediamine, hemoglobin powder, and hydrogen peroxide 30% (*v/v*) were purchased from Sigma Aldrich Merck (Madrid, Spain). The phosphate buffers (0.02 M NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ pH 1.5–9.5) were prepared by dissolution of the needed reagents in water, and the pH was adjusted by adding 1 M or 0.2 M HCl and NaOH. The working solutions of H₂O₂ and hemoglobin were prepared daily with the dilution of

the standards in water. All the aqueous solutions were prepared in purified water (resistance 18.2 M Ω -cm) obtained from a Milli-RO 12 plus Milli-Q station (Millipore, Bedford, MA, USA).

2.2. Instrumentation

Microwave MicroSYNTH (Milestone Srl, Sorisole, BG, Italy) was used for CD synthesis. High-resolution transmission electron microscopy (HR-TEM) images were obtained from an FEI TITAN G2 60–300 field-emission instrument (Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA) equipped with a HAADF detector. The samples were prepared at room temperature in air by depositing a drop of aqueous solution of CDs on a commercial 400 μ m mesh carbon Cu-grid. Fourier transform infrared spectra (FTIR) were obtained using a Spectrum Two FTIR spectrometer (PerkinElmer Inc., Waltham, MA, USA). The X-ray diffraction (XRD) was carried out on a D2 phaser diffractometer (Bruker, Karlsruhe, Germany). X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) analyses were done on a Kratos Axis Ultra-DLD (Kratos Analytical, Manchester, UK). All of these studies were performed at the Centre of Scientific Instrumentation (University of Granada, Spain). Dynamic light scattering (DLS) measurements were done on a Zetasizer Nanoseries, Nano-ZS90 (Malvern Panalytical, Malvern, Worsts, UK).

Phosphorescence measurements were obtained with a Cary Eclipse UV–Vis fluorescence spectrophotometer (Varian Iberica, Madrid, Spain) equipped with a xenon discharge lamp (peak power equivalent to 75 kW), Czerny–Turner monochromators, and an R-928 photomultiplier tube, which is red sensitive (900 nm), with manual or automatic voltage controlled by Cary–Eclipse software (Agilent, Santa Clara, CA, USA, Cary OS/2 software) for Windows 95/98/NT systems. For the spectra of RTP, the samples were excited at 340 nm and the emission spectra were measured in a wavelength range of 350 to 650 nm, integration time (t_g) of 5 ms, and delay time (t_d) of 0.2 ms in phosphorescence mode. The photomultiplier voltage was 800 V, and the excitation and emission slits were 10 nm. All measurements were made in a quartz cell with a 10 mm optical path. The UV–Vis spectra were collected using an Agilent 8453 diode array spectrophotometer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The pH was measured using a Crison micropH 2000 pH meter (Hach Lange Spain, Barcelona, Spain). Finally, a proprietary portable device was used to measure the luminescence attenuation at increasing concentrations of hemoglobin.

2.3. Synthesis of the CDs

In this paper we used one-pot synthesis to prepare soluble CDs in water without any surface modification by hydrothermal treatment. An aqueous mixture of 10 g of citric acid and 5 mL of ethylenediamine was heated at 180 °C in a 50 mL Teflon-lined steel autoclave for 8 h. After cooling to room temperature, the resultant yellow solution was centrifuged at 3500 rpm for 10 min. The CDs were purified by dialysis (cut-off 1 kD) for 24 h to remove unreacted materials. The CDs, synthesized as a pale-yellow powder (0.2% yield calculated after lyophilization), were stored at room temperature until their use. A standard solution of 0.24 mg·mL⁻¹ CDs was prepared in water with the help of an ultrasonic bath sonicator.

2.4. Measuring Setup for the Portable Device

The measuring setup basically consisted of three main blocks: an exciting light source, a photodiode, and the reconfigurable analog/digital controller. The UV LED EOLD-365-525 (OSA Opto Light, Berlin, Germany) was used as the excitation source ($\lambda = 365$ nm) of the CDs, which were located in a dark chamber specially designed for this purpose. The luminescence emission was acquired using a photodiode S2387-66R (Hamamatsu Photonics K.K., Hamamatsu, Japan) aligned perpendicularly with respect to the emission pattern of the UV LED (as shown in Figure 1). To consider only the effect of the CDs luminescence, an optical filter (KOOD International, Japan) was placed directly in front of the photodiode to avoid the influence of undesirable light reflections.

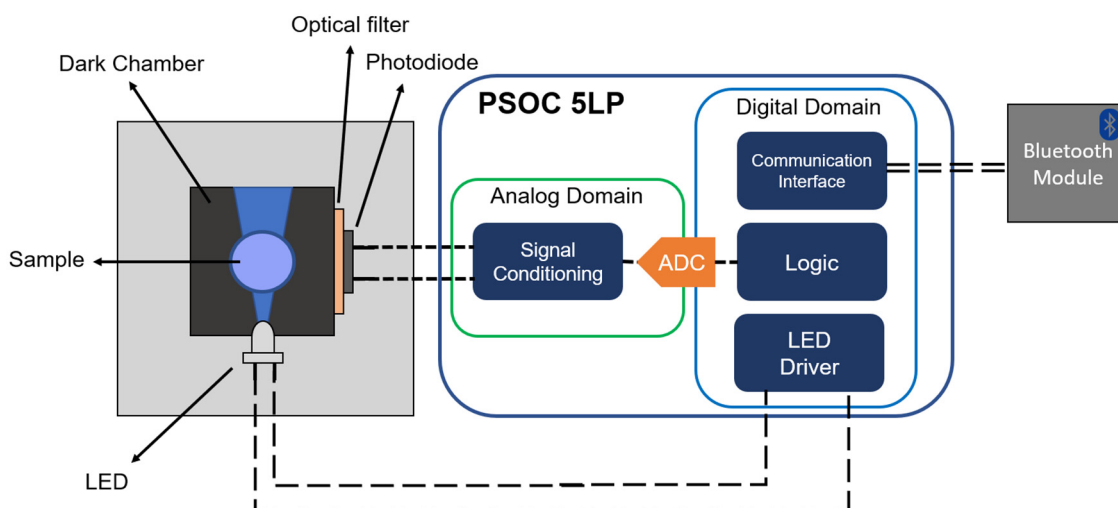


Figure 1. Block diagram of the developed device showing the electronics module and the measurement setup.

The control of the excitation LED and the acquisition of the signal from the photodiode were carried out using a programmable system-on-chip (5LP, Cypress Semiconductor, San Jose, CA, USA), specifically the CY8CKIT-010 development kit.

This low-power system-on-chip (SoC) has a reconfigurable architecture that integrates a programmable analog domain together with a powerful signal processing engine (32-bit Arm[®] Cortex[®]-M0+), which allows both analog signal conditioning and digital processing, and provides a communication control interface.

The block diagram of the developed instrument is schematized in Figure 1. As can be seen, only the photoelectronic module (LED and photodiode) and the Bluetooth module were the out-of-chip components. Thus, the signal obtained from the photodiode was fully conditioned using the analog domain of the PSoC before its conversion to the digital domain using an Analog-to-Digital Converter (ADC).

2.5. Measurement Algorithm

The phosphorescence intensity and lifetime of the luminescence decay were obtained following a method similar to that proposed by López-Ruiz et al. [13], which is based on the integration of the luminescence signal over three different windows of time, as schematized in Figure 2. First, before the optical excitation of the sample, the signal obtained from the photodiode is integrated over the time window T_1 . During this interval the value of the signal is almost constant and corresponds to the offset due to the photodiode dark current. Secondly, the sample is optically excited after which, once the luminescence reaches the steady state, the signal is integrated over a time window T_2 . Finally, the LED is turned off again and, after waiting a delay time t_d to avoid the background fluorescence, the signal is integrated again over the time window T_3 , which is wide enough to cover the whole decay time.

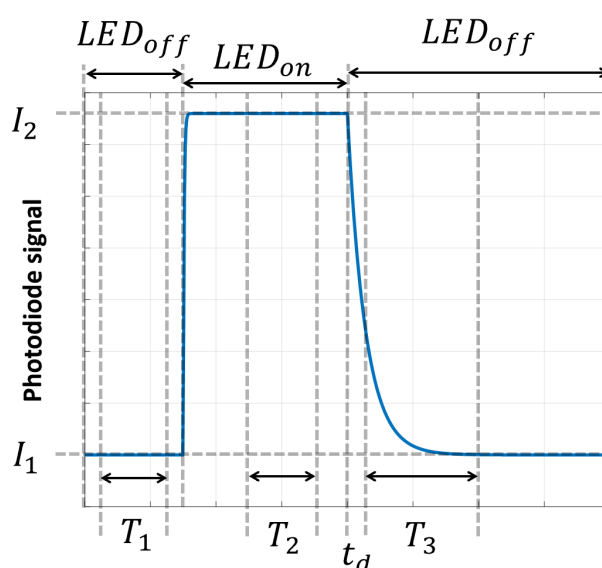


Figure 2. Measurement scheme based on three time windows.

Therefore, both the offset (I_1) and intensity of the luminescence in excited steady state (I_2) can be obtained from Equation (1).

$$I_i = \frac{D_i}{T_i}, \quad i = 1, 2 \quad (1)$$

where D_i is the result of the integration of the signal over the time window T_i .

Moreover, it has already been demonstrated that for a time window much longer than the lifetime, $T_3 \gg \tau$, the value of the mean lifetime of an n^{th} -order exponential can be obtained assuming a mono-exponential decay with notional lifetime τ [20]. Thus, the integration of the decay over the time window T_3 results in

$$D_3 = \int_{t_d}^{T_3} (I_2 e^{-(t/\tau)} + I_1) dt \cong I_2 \tau + I_1 (T_3 - t_d) \quad (2)$$

provided that $T_3 \gg \tau$ and $t_d \ll \tau$.

Then, the lifetime can be determined from Equations (1) and (2) as follows:

$$\tau = \frac{D_3 - \frac{D_1}{T_1} (T_3 - t_d)}{\frac{D_2}{T_2}} \quad (3)$$

Furthermore, we also obtained the ratio of change in the amplitude of the phosphorescence decay in order to calculate the concentration of the analyte. For that, we used the area measured over the time window T_3 , as indicated in Equation (4).

$$\frac{I_0}{I_i} = \frac{D_{30} - \frac{D_{10}}{T_1} \cdot T_3}{D_{3i} - \frac{D_{1i}}{T_1} \cdot T_3} \quad (4)$$

where I_0 is the amplitude in absence of the analyte, and I_i this amplitude obtained for a given analyte concentration.

2.6. Room-Temperature Phosphorescence Hb Determination

The typical procedure was carried out as follows: A series of solutions from 0.24 mg·mL⁻¹ CDs to 15 mM H₂O₂ were prepared and diluted to 3 mL with phosphate buffer (0.02 M NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, pH 4.7) to achieve the final concentration of 2.8 × 10⁻³ mg·mL⁻¹ of CDs and 0.5 mM H₂O₂. Next,

increasing volumes of the 300 μM Hb stock solution to calibrate or Hb containing the sample were added to previous solutions, and the RTP intensities of the solutions were determined after 5 min at room temperature using standard 10 mm quartz cells. The average of the data from three independent measurements were obtained. The same procedure was applied to the preparation of the samples for Hb determination using the portable device.

2.7. Real Sample Measurement

Blood samples were obtained from laboratory volunteers; 10 μL of sample were diluted to 7 mL with Milli-Q water and incubated for 30 min to release the Hb from the red blood cells. After centrifugation at 3000 rpm for 10 min, 10 μL of the sample were added to 3 mL of buffer solutions with of 2.8×10^{-3} $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ CDs and 0.5 mM H_2O_2 . Then, the procedure for Hb determination was applied.

3. Results and Discussion

3.1. Carbon Dot Characterization

In general, the formation of CDs doped with N mainly involves two processes: condensation and carbonization. During these processes, the carboxyl and hydroxyl groups of citric acid and the amino groups of ethylenediamine undergo complex condensation and carbonization reactions involving intramolecular condensation to form small-molecule fluorophores, such as 5-oxo-1,2,3,5-tetrahydroimidazo[1,2a]pyridine-7-carboxylic acid [29] as well as carbon core-containing nitrogen-doped carbon dots. The resulting molecular fluorophores are hypothesized to be located on the surface and/or inside the CDs.

The size, morphology and structure of the synthesized CDs were studied by HR-TEM, EDX, XPS, FTIR, and XRD. The HR-TEM image of the CDs (Figure 3A) shows that the CDs were spherical with a low degree of agglomeration. The particle size distribution histogram was obtained from HR-TEM and presented in Figure 3A. The sizes of CDs were distributed in a narrow range of 1–5 nm with an average particle size of 2.5 nm in HR-TEM, and particle sizes of CDs obtained by DLS measurement (Figure 3B) were shown to be ~ 10 nm, which is the normal size of CDs. Elemental analyses by EDX were performed to discover the composition of the CDs, showing that C, N, and O atoms were present in the composition of CDs (see Figure 3C). XRD was carried out, as seen in Figure 3E. A diffraction peak was observed at $2\Phi = 21.5^\circ$, which is typical for the amorphous crystal phase.

The FTIR spectrum of the CDs (Figure 3F) showed the characteristic bands of COOH stretching at 3440 cm^{-1} and 1637 cm^{-1} ; NH bending at 1585 cm^{-1} ; C–N stretching at 1122 cm^{-1} ; and CH asymmetric and symmetric stretching at 2950 and 2820 cm^{-1} , respectively. These data suggest the presence of different functional groups such as –OH, –COOH, and –NH₂ on the surface of CDs [30].

Additionally, the elemental composition of the CDs was performed by XPS surface analysis. As expected, the obtained data for the elemental composition of the CDs indicate the presence of a carbon peak (C1s) at about 284 eV, an oxygen peak (O1s) at about 530 eV, and a nitrogen peak (N1s) at about 398 eV. Additionally, the atomic quantification shows 69.37% C1s, 16.62% O1s, and 14.02% N1s atoms, (Figure 3D).

3.2. Optical Properties of the Synthesized CDs

The presence of different surface groups such as hydroxyl, amine, or carboxyl on CDs improves their stability and modulates the luminescent properties, paving the way for new sensing applications. The prepared CDs showed a UV–Vis absorption spectrum with a maximum at 350 nm, attributed to the $n\text{--}\pi^*$ transition of C=O bonds [31] (Figure 4A), and an emission spectrum ranging from approximately 400 to 550 nm, with an emission behavior independent of the excitation, and a maximum luminescence wavelength at 442 nm, with a full width at half maximum (FWHM) of around 110 nm (Figure 4B).

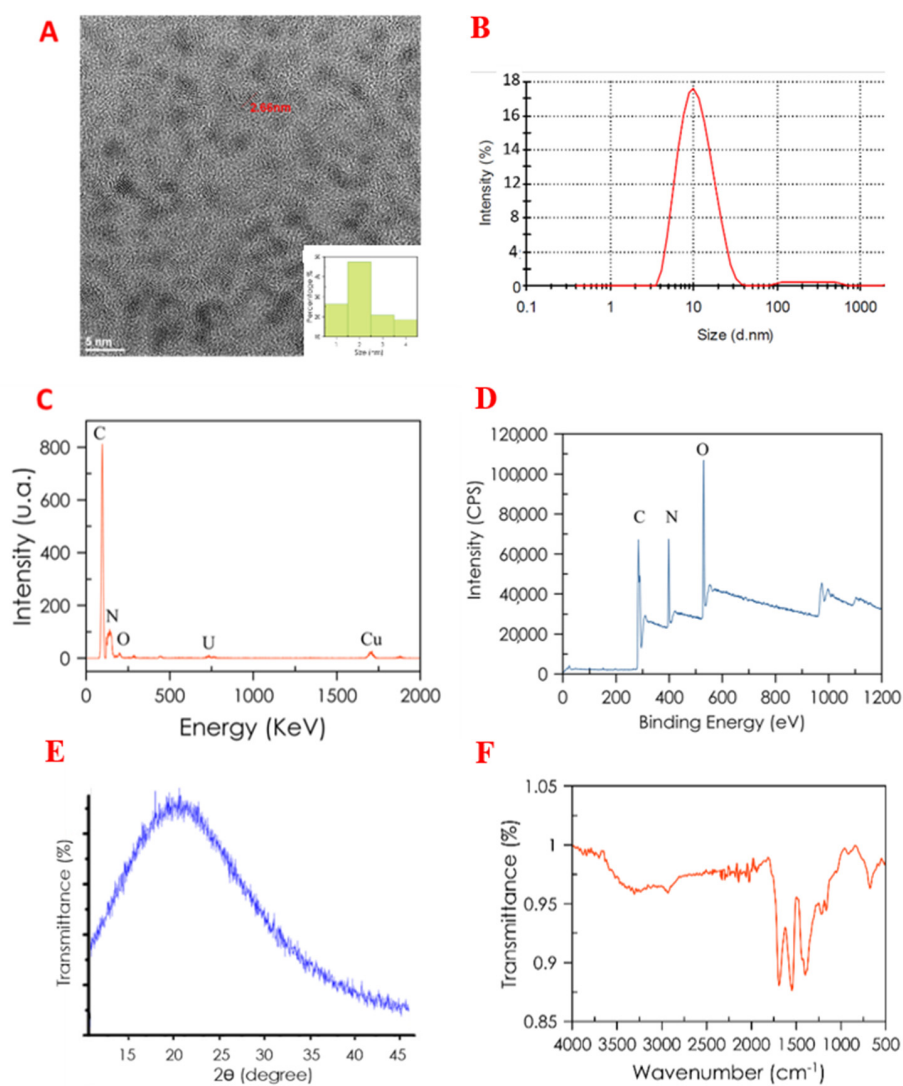


Figure 3. Characterization of carbon dots (CDs). (A) HR-TEM image; (B) CDs size distribution using DLS; (C) EDX spectrum. (D) XPS spectra: C1s peak: 284 eV; N1s peak: 398 eV, and O1s peak: 530 eV. (E) XRD pattern and (F) FTIR spectrum of CDs.

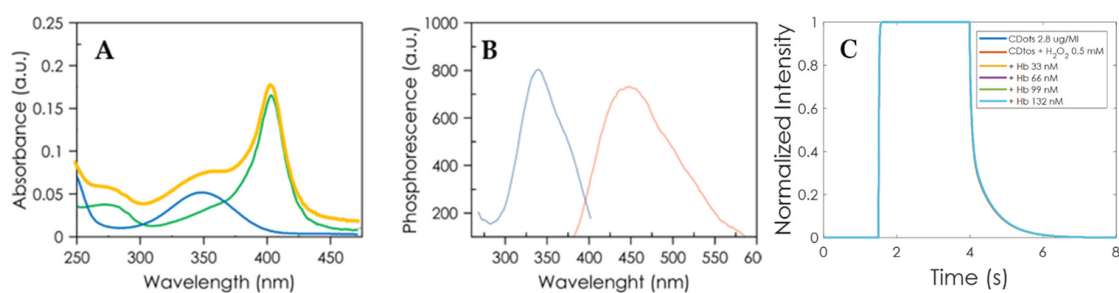


Figure 4. (A) UV spectra of CD solution (2.8×10^{-3} mg·mL⁻¹ CDs, blue line), Hb solution (0.5 μ M Hb, green line), and CDs/Hb solutions (yellow line), all in 0.02 M NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ (pH = 4.7) buffer. (B) Room temperature phosphorescence spectra of CD solution (2.8×10^{-3} mg·mL⁻¹ CDs), blue line excitation spectrum and red line emission spectrum. (C) Normalized photoluminescence decay for different Hb concentrations. The offset of the curves was removed.

It must be taken into account that for the synthesized carbon dots, they exhibited two photoluminescence processes that competed simultaneously (that is, fluorescence and phosphorescence emissions), both emitting near the same spectral range.

Yan et al. [32], in his study of the same CDs studied by us from citric acid and ethylenediamine, attributes the observed phosphorescence to both the aromatic carbonyl groups present and to the graphitic structure of the CDs, which is similar to the aromatic polycyclic structure; these polycyclic aromatic hydrocarbons are a family of compounds well known for their phosphorescent properties.

The relative fluorescence quantum yield (QY) of the CDs was determined using a slope method described in the literature [33]. The relative QY fluorescence of the CDs obtained using quinine sulfate as standard was 0.41 ± 0.05 as the average of three measurements.

3.3. The Mechanism of Quenching Carbon Dots Luminescence by Hb

The Hb spectrum presented a significant band at 407 nm and another minor band at 280 nm. The aqueous solution of luminescent CDs upon addition of Hb showed an overlap in the absorption spectra, a quenching, and a small red-shift in their emission spectra. The quenching was attributed to the inner filter effect (IFE) by the partial overlap of the Hb spectra with the CDs emission spectra [34]. To confirm this mechanism, in addition to the overlap in the spectra, we calculated the lifetimes of the system. This was confirmed by the phosphorescence lifetime calculated with the portable instrument (see Figure 4C), in which these decays had a mean lifetime of $\tau = 228.8 \pm 4.5$ ms, which was calculated using a time window of $T_1 = T_2 = T_3 = 1.5$ s and a time delay of $t_d = 1$ ms. These results show that the developed portable instrument is capable of measuring phosphorescent lifetimes, which is very interesting for future sensing applications.

Moreover, the addition of H_2O_2 to the solution containing CDs and Hb dramatically increased the luminescence quenching of CDs. Barati et al. [31] suggest a different quenching mechanism from IFE. In short, in the first step, Hb reacts to H_2O_2 generating reactive oxygen species (ROS), mainly hydroxyl $\cdot OH$ and superoxide $O_2^{\cdot -}$ radicals, which occurs with heme group degradation and iron release. The subsequent oxidation of the surface hydroxyls of the CDs modifies the surface structure, leading to luminescent quenching [35].

3.4. Assay Optimization

Firstly, a study of the effect of the solution reaction time, pH, and H_2O_2 was conducted. The equilibration time was studied, finding that 6 min is sufficient to obtain stable measurements. The influence of pH on the response was investigated in the range of 1.5–9.5 (0.02 M NaH_2PO_4/Na_2HPO_4 buffer). As shown in Figure 5A, the greatest attenuation occurred at pH 4, dramatically decreasing in both more acidic and basic media. Likewise, the concentration of H_2O_2 exerted a great effect on the attenuation of luminescence (Figure 5B), with 0.5 mM being the optimal value.

3.5. Prototype Implementation and App Application

As described above, the phosphorescence intensity and lifetime measurement algorithm was implemented in a reconfigurable device whose full hardware configuration is shown in Figure 6 and implemented in the portable device in Figure 7. This design was implemented using the PSoC Creator Integrated Design Environment (IDE), which makes it possible to configure the different hardware modules and implement the firmware. As seen in Figure 1, the LED driver responsible for controlling the excitation source was implemented through a pulse-width modulation (PWM) module. This module generates two digital signals, which are connected to two hardware triggered interrupts to turn on/off the LED. This implementation based on interruptions makes it possible to monitor the time intervals in which the excitation LED is turned on/off very accurately. The signal obtained from the photodiode is amplified ($A_v = 4$ V/V) using a programmable gain amplifier (PGA) to adapt the signal to the dynamic range of the analog digital converter (ADC) module, which was configured as singled-ended. The ADC converts the signal recorded from the photodiode to the digital

domain at a sampling rate of 250 kHz and a resolution of 12 bits, generating an end of conversion (EOC) interruption every time that a new conversion is completed. Therefore, the integration of the signal over each time window yields Equations (5) and (6) as follows:

$$D_i = \sum_{j=0}^{N=\frac{T_i}{T_S}} V_{ADCj} \cdot T_S = F_S \cdot \sum_{j=0}^{T_i \cdot F_S} V_{ADCj}, \quad i = 1, 2 \quad (5)$$

$$D_3 = \sum_{j=0}^{N=\frac{T_3}{T_S}} (V_{ADCj} - \frac{D_1}{T_1}) \cdot T_S = F_S \cdot \sum_{j=0}^{T_3 \cdot F_S} (V_{ADCj} - \frac{D_1}{T_1}) \quad (6)$$

where T_S and F_S are the sampling period and the sampling frequency, respectively, and V_{ADCj} is the value of the j^{th} conversion.

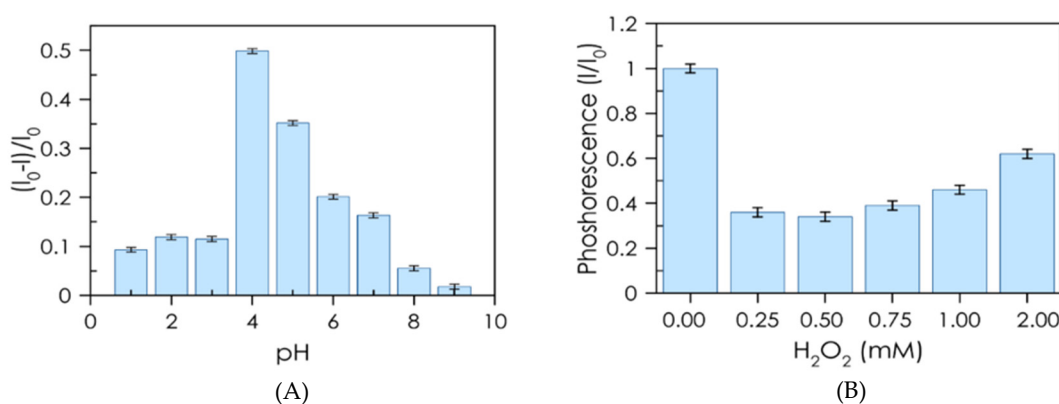


Figure 5. (A) pH dependence of luminescence quenching; $2.8 \times 10^{-3} \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ CDs, $0.5 \text{ mM H}_2\text{O}_2$, $1 \mu\text{M Hb}$ in 0.02 M phosphate buffers. (B) Influence of H_2O_2 concentration on luminescence quenching; $2.8 \times 10^{-3} \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ CDs, $0.15 \mu\text{M Hb}$ in $0.02 \text{ M NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4 \text{ pH} = 4.7$ buffer.

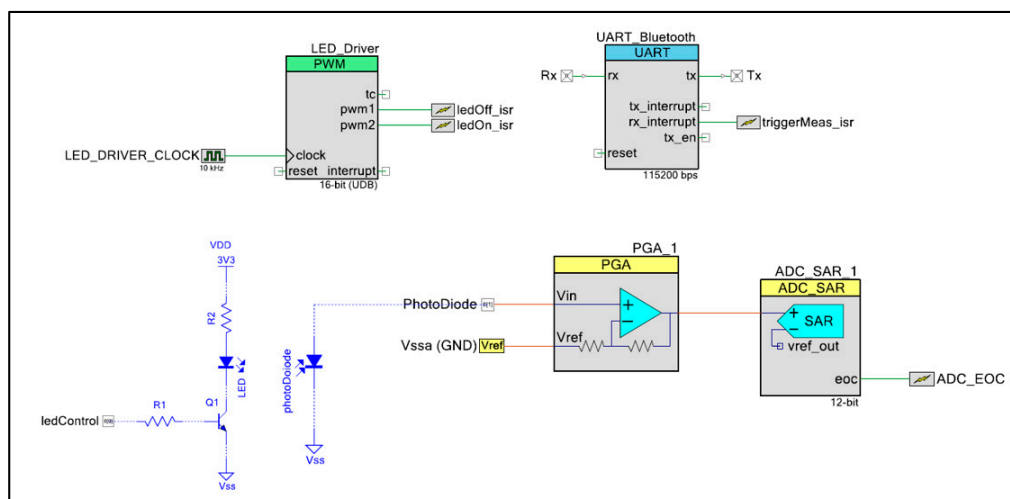


Figure 6. Diagram block of the developed instrument showing the electronics part and the measurement setup.

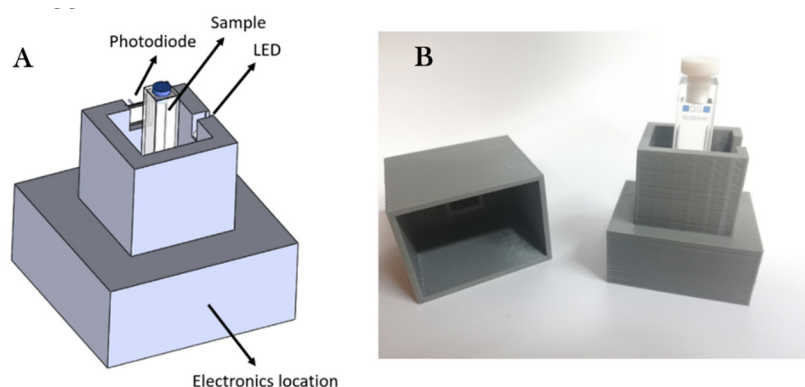


Figure 7. A 3D model (A) and real view (B) of the final portable instrument.

Once the lifetime is calculated using Equation (3), it is sent by the Bluetooth interface, implemented as an external Bluetooth Low-Energy (BLE) module based on the CC2541 system-on-chip (SoC) (Texas Instrument, Dallas, TX, USA). A full-duplex universal asynchronous receiver-transmitter (UART) module is the interface with the BLE module, which works as a slave of a central/master device. In this work, the master device is a smartphone that runs an app for data visualization and triggers new measurements.

3.6. Interference Study

One of the major challenges in the determination of Hb is the selectivity required in the presence of interfering ions and various biologically important species commonly found in real samples that may hamper the analytical application to Hb sensing. To evaluate whether this approach is highly specific for Hb, the quenching of CD suspensions was recorded in the presence of different interfering species, both molecules and ions (final concentration of 10 μM) typically found in blood samples, i.e., ascorbic acid, glucose, uric acid, K^+ , Mg^{2+} , Na^+ , and Ca^{2+} . None of these species elicited a discernible effect on the phosphorescence response of CDs/ H_2O_2 for the determination of Hb (Figure 8). These results confirm that neither inorganic nor organic analytes found in blood interfere with our assay, validating the selectivity of the phosphorescence system towards Hb.

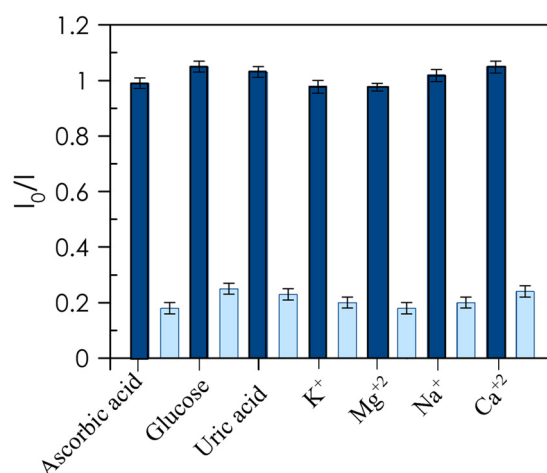


Figure 8. Selectivity of RTP assay. Response of interferents (10 μM for ascorbic acid, glucose, and uric acid and 0.1 mM for cations) and response of Hb (100 nM) in the presence of interferents.

3.7. Analytical Characterization of the Portable Luminescent Instrumentation

The feasibility of the developed instrument was tested using the CDs as a phosphorescent probe and measuring the change in quenching phosphorescence in the presence of Hb at different assay concentrations.

Furthermore, we extracted the intensity-based (I_0/I) Stern–Volmer plot using Equation (4) for the different Hb concentrations. This plot makes it possible to define a calibration function to determine the concentration of analyte (Hb) from the ratio between the intensity in the absence of Hb and the intensity measured for a certain concentration of Hb. The calibration function obtained in this case is indicated in Equation (7), a linear dynamic range from 19 nM to 125 nM and a correlation coefficient of 0.9976. The LOD was calculated using the standard criteria, namely $LOD = 3\sigma/\text{slope}$, where σ is the standard deviation ($n = 20$) of the difference in luminescence intensity between a CD solution and a blank solution; in this case, the criterion for the quantification limit (LOQ) was $10\sigma/\text{slope}$. With this criterion, the value of the LOD was 6.2 nM, and the LOQ was 18.8 nM. Then, the Hb concentration could be extracted using this calibration curve and the ratio of intensities previously measured. Finally, this value was sent by the Bluetooth interface to the Android app (Figure 9). The app, in addition to simply working as a display of this value, is also used to trigger new measurements. A comparative study of different analytical performance for colorimetric and fluorimetric detection of GSH is presented in Table 1.

$$\frac{I_0}{I} = 320 \cdot 10^{-6} \cdot \text{Hb} + 1; R^2 = 0.9976 \quad (7)$$

3.8. Application to Real Sample Analysis

Despite the good selectivity of phosphorescence CDs to detect Hb in the presence of interfering ions, the problem of unspecific interferences is hard to tackle due to the inherent compositional complexity of real biological samples. To validate the selectivity of the proposed assay for Hb determination in blood, samples from two healthy human volunteers were analyzed after a large dilution of samples to reduce any interference. Moreover, the quantification after addition of a known amount of Hb (0.040 and 0.080 μM) in the diluted blood samples showed a good recovery percentage (Table 2). These results demonstrated the good accuracy of phosphorescence CDs for Hb determination in human blood.

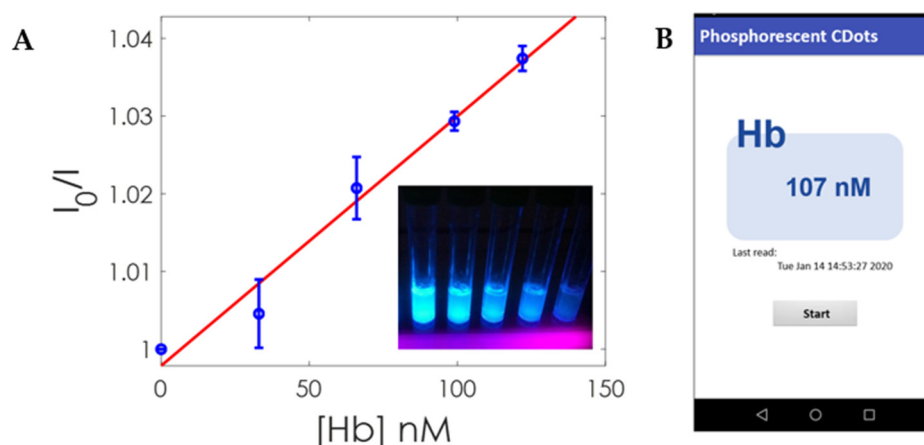


Figure 9. (A) Intensity based (I_0/I) Stern–Volmer plot for different concentrations of Hb. Inset shows a UV-illuminated photograph of CDs with different concentrations of Hb. (B) App screenshot showing the result of one measurement.

Table 1. Comparison of performance of proposed method for Hb with literature.

Method	Materials	Linear Range (nM)	LOD (nM)	References
Colorimetry	Curcumin nanoparticles	15.5–620	1.55	[16]
Colorimetry	G-quadruplex DNAzymes	1–120	0.64	[36]
Fluorimetry	Molecular Imprinting Polymers	25–3000	7.8	[21]
Fluorimetry	Terbium complexes	9–540	3	[37]
Fluorimetry	CdHgSe QDs	4–440	2	[38]
Fluorimetry	CDs	1–4000	0.12	[39]
Fluorimetry	BSA-AuNCs	1–250	0.36	[17]
Fluorimetry	AuNCs	10–2000	5	[22]
Fluorimetry	Silicon nanoparticles	50–4000	40.0	[40]
RTP	CDs	19–125	6.2	This work

Table 2. Hb determination in real blood samples.

Samples	Concentration of Hb				Recovery %
	Detected (μM)	Blood (mM)	Added (μM)	Recovered (μM)	
Volunteer 1	0.050	10.500	0.040	0.052	93.6
			0.080	0.085	105.9
Volunteer 2	0.045	9.450	0.040	0.038	95.0
			0.080	0.087	108.4

4. Conclusions

The determination of Hb was carried out using a portable reconfigurable device developed in our laboratory for the room-temperature phosphorescence measurement of CDs. The development sensor combines the nanoparticles with the RTP detection, resulting in a significant improvement in the selectivity and sensitivity of the detection of Hb.

The portable device allowed for the determination of Hb with good sensitivity, and a detection limit of 6.2 nM for Hb was reached within a linear range up to 120 nM in concentration. The analytical applicability of the portable instrument was successfully demonstrated by blood analysis. The adjustment of the measuring range using a reconfigurable electronic system has great potential for future applications. This instrument offers the advantages of versatility, portability and accuracy for RTP measurements.

Author Contributions: Conceptualization, L.F.C.-V. and A.S.-C.; methodology, D.P.M. and F.J.G.R.; software, R.S.-M. and F.J.R.; validation, F.M.; investigation, F.M., F.J.R., and R.S.-M.; writing—original draft preparation, F.M., F.J.R., and F.J.G.R.; writing—review and editing, A.S.-C., D.P.M., and L.F.C.-V.; funding acquisition, L.F.C.-V. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by projects from the MINECO (Spain) (CTQ2016-78754-C2-1-R) and partially supported by European Regional Development Funds (ERDF).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Bandodkar, A.J.; Wang, J. Non-invasive wearable electrochemical sensors: A review. *Trends Biotechnol.* **2014**, *32*, 363–371. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Werle, P.; Slemr, F.; Maurer, K.; Kormann, R.; Mücke, R.; Jänker, B. Near- and mid-infrared laser-optical sensors for gas analysis. *Opt. Lasers Eng.* **2002**, *37*, 101–114. [[CrossRef](#)]

3. Salinas-Castillo, A.; Morales, D.P.; Lapresta-Fernández, A.; Ariza-Avidad, M.; Castillo, E.; Martínez-Olmos, A.; Palma, A.J.; Capitan-Vallvey, L.F. Evaluation of a reconfigurable portable instrument for copper determination based on luminescent carbon dots. *Anal. Bioanal. Chem.* **2016**, *408*, 3013–3020. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Liebsch, G.; Klimant, I.; Frank, B.; Holst, G.; Wolfbeis, O.S. Luminescence Lifetime Imaging of Oxygen, pH, and Carbon Dioxide Distribution Using Optical Sensors. *Appl. Spectrosc.* **2000**, *54*, 548–559. [[CrossRef](#)]
5. Misiakos, K.; Raptis, I.; Makarona, E.; Botsialas, A.; Salapatas, A.; Oikonomou, P.; Psarouli, A.; Petrou, P.S.; Kakabakos, S.E.; Tukkiniemi, K.; et al. All-silicon monolithic Mach-Zehnder interferometer as a refractive index and bio-chemical sensor. *Opt. Express* **2014**, *22*, 26803–26813. [[CrossRef](#)]
6. Ulep, T.-H.; Yoon, J.-Y. Challenges in paper-based fluorogenic optical sensing with smartphones. *Nano Converg.* **2018**, *5*, 1–11. [[CrossRef](#)]
7. Huang, X.; Xu, D.; Chen, J.; Liu, J.; Li, Y.; Song, J.; Ma, X.; Guo, J. Smartphone-based analytical biosensors. *Analyst* **2018**, *143*, 5339–5351. [[CrossRef](#)]
8. Silvi, S.; Credi, A. Luminescent sensors based on quantum dot–molecule conjugates. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 4275–4289. [[CrossRef](#)]
9. McDonagh, C.; Burke, C.S.; MacCraith, B.D. Optical Chemical Sensors. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 400–422. [[CrossRef](#)]
10. Franke, R.; Holst, G. Frequency-domain fluorescence lifetime imaging system (pco.flim) based on a in-pixel dual tap control CMOS image sensor. *SPIE* **2015**, 9328. [[CrossRef](#)]
11. Chen, H.; Holst, G.; Gratton, E. Modulated CMOS camera for fluorescence lifetime microscopy. *Microsc. Res. Tech.* **2015**, *78*, 1075–1081. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Fu, G.; Sonkusale, S.R. A CMOS Luminescence Intensity and Lifetime Dual Sensor Based on Multicycle Charge Modulation. *IEEE Trans. Biomed. Circ. Syst.* **2018**, *12*, 677–688. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Schwartz, D.E.; Charbon, E.; Shepard, K.L. A Single-Photon Avalanche Diode Array for Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy. *IEEE J. Solid-State Circ.* **2008**, *43*, 2546–2557. [[CrossRef](#)]
14. Kassal, P.; Steinberg, M.D.; Steinberg, I.M. Wireless chemical sensors and biosensors: A review. *Sens. Actuators B Chem.* **2018**, *266*, 228–245. [[CrossRef](#)]
15. López-Ruiz, N.; Hernández-Bélangier, D.; Carvajal, M.A.; Capitán-Vallvey, L.F.; Palma, A.J.; Martínez-Olmos, A. Fast lifetime and amplitude determination in luminescence exponential decays. *Sens. Actuators B Chem.* **2015**, *216*, 595–602. [[CrossRef](#)]
16. Pourreza, N.; Golmohammadi, H. Hemoglobin detection using curcumin nanoparticles as a colorimetric chemosensor. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 1712–1717. [[CrossRef](#)]
17. Yang, D.; Meng, H.; Tu, Y.; Yan, J. A nanocluster-based fluorescent sensor for sensitive hemoglobin detection. *Talanta* **2017**, *170*, 233–237. [[CrossRef](#)]
18. Hong, J.; Zhao, Y.-X.; Xiao, B.-L.; Moosavi-Movahedi, A.A.; Ghourchian, H.; Sheibani, N. Direct electrochemistry of hemoglobin immobilized on a functionalized multi-walled carbon nanotubes and gold nanoparticles nanocomplex-modified glassy carbon electrode. *Sensors* **2013**, *13*, 8595–8611. [[CrossRef](#)]
19. van Bommel, M.R.; de Jong, A.P.J.M.; Tjaden, U.R.; Irth, H.; van der Greef, J. High-performance liquid chromatography coupled to enzyme-amplified biochemical detection for the analysis of hemoglobin after pre-column biotinylation. *J. Chromatogr. A* **2000**, *886*, 19–29. [[CrossRef](#)]
20. Takakata, M.; Hiroshi, O.; Umeko, S. A modification of Van Kampen-Zijlstra’s reagent for the hemoglobinocyanide method. *Clin. Chim. Acta* **1979**, *93*, 163–164. [[CrossRef](#)]
21. Yang, Q.; Li, J.; Wang, X.; Xiong, H.; Chen, L. Ternary Emission of a Blue-, Green-, and Red-Based Molecular Imprinting Fluorescence Sensor for the Multiplexed and Visual Detection of Bovine Hemoglobin. *Anal. Chem.* **2019**, *91*, 6561–6568. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Lu, F.; Yang, H.; Yuan, Z.; Nakanishi, T.; Lu, C.; He, Y. Highly fluorescent polyethyleneimine protected Au₈ nanoclusters: One-pot synthesis and application in hemoglobin detection. *Sens. Actuators B Chem.* **2019**, *291*, 170–176. [[CrossRef](#)]
23. Tao, S.; Lu, S.; Geng, Y.; Zhu, S.; Redfern, S.A.T.; Song, Y.; Feng, T.; Xu, W.; Yang, B. Design of Metal-Free Polymer Carbon Dots: A New Class of Room-Temperature Phosphorescent Materials. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 2393–2398. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Zu, F.; Yan, F.; Bai, Z.; Xu, J.; Wang, Y.; Huang, Y.; Zhou, X. The quenching of the fluorescence of carbon dots: A review on mechanisms and applications. *Microchim. Acta* **2017**, *184*, 1899–1914. [[CrossRef](#)]

25. Wang, R.; Wang, X.; Sun, Y. Aminophenol-based carbon dots with dual wavelength fluorescence emission for determination of heparin. *Microchim. Acta* **2017**, *184*, 187–193. [[CrossRef](#)]
26. Li, J.; Wang, B.; Zhang, H.; Yu, J. Carbon Dots-in-Matrix Boosting Intriguing Luminescence Properties and Applications. *Small* **2019**, *15*, 1805504. [[CrossRef](#)]
27. Carvajal, M.A.; Ballesta-Claver, J.; Morales, D.P.; Palma, A.J.; Valencia-Mirón, M.C.; Capitán-Vallvey, L.F. Portable reconfigurable instrument for analytical determinations using disposable electrochemiluminescent screen-printed electrodes. *Sens. Actuators B Chem.* **2012**, *169*, 46–53. [[CrossRef](#)]
28. Romero, F.J.; Rivadeneyra, A.; Toral, V.; Castillo, E.; García-Ruiz, F.; Morales, D.P.; Rodriguez, N. Design guidelines of laser reduced graphene oxide conformal thermistor for IoT applications. *Sens. Actuators A Phys.* **2018**, *274*, 148–154. [[CrossRef](#)]
29. De los Reyes-Berbel, E.; Ortiz-Gomez, I.; Ortega-Muñoz, M.; Salinas-Castillo, A.; Capitán-Vallvey, L.F.; Hernandez-Mateo, F.; Lopez-Jaramillo, F.J.; Santoyo-Gonzalez, F. Carbon dots-inspired fluorescent cyclodextrins: Competitive supramolecular “off-on” (bio)sensors. *Nanoscale* **2020**. [[CrossRef](#)]
30. Lakard, S.; Herlem, G.; Lakard, B.; Fahys, B. Theoretical study of the vibrational spectra of polyethylenimine and polypropylenimine. *J. Mol. Struct.: THEOCHEM* **2004**, *685*, 83–87. [[CrossRef](#)]
31. Barati, A.; Shamsipur, M.; Abdollahi, H. Hemoglobin detection using carbon dots as a fluorescence probe. *Biosensors Bioelectron.* **2015**, *71*, 470–475. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Yan, X.; Chen, J.-L.; Su, M.-X.; Yan, F.; Li, B.; Di, B. Phosphate-containing metabolites switch on phosphorescence of ferric ion engineered carbon dots in aqueous solution. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 22318–22323. [[CrossRef](#)]
33. Williams, A.T.R.; Winfield, S.A.; Miller, J.N. Relative fluorescence quantum yields using a computer-controlled luminescence spectrometer. *Analyst* **1983**, *108*, 1067–1071. [[CrossRef](#)]
34. Shang, L.; Dong, S. Design of Fluorescent Assays for Cyanide and Hydrogen Peroxide Based on the Inner Filter Effect of Metal Nanoparticles. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 1465–1470. [[CrossRef](#)]
35. Sun, X.; Lei, Y. Fluorescent carbon dots and their sensing applications. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2017**, *89*, 163–180. [[CrossRef](#)]
36. Li, R.; Jiang, Q.; Cheng, H.; Zhang, G.; Zhen, M.; Chen, D.; Ge, J.; Mao, L.; Wang, C.; Shu, C. G-quadruplex DNAzymes-induced highly selective and sensitive colorimetric sensing of free heme in rat brain. *Analyst* **2014**, *139*, 1993–1999. [[CrossRef](#)]
37. Yegorova, A.V.; Leonenko, I.I.; Aleksandrova, D.I.; Scrypynets, Y.V.; Antonovich, V.P.; Ukrainets, I.V. Novel Luminescent Probe Based on a Terbium(III) Complex for Hemoglobin Determination. *J. Appl. Spectrosc.* **2014**, *81*, 672. [[CrossRef](#)]
38. Wang, Q.; Zhan, G.; Li, C. Facile synthesis of N-acetyl-l-cysteine capped CdHgSe quantum dots and selective determination of hemoglobin. *Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc.* **2014**, *117*, 198–203. [[CrossRef](#)]
39. Huang, S.; Wang, L.; Huang, C.; Xie, J.; Su, W.; Sheng, J.; Xiao, Q. A carbon dots based fluorescent probe for selective and sensitive detection of hemoglobin. *Sens. Actuators B Chem.* **2015**, *221*, 1215–1222. [[CrossRef](#)]
40. Li, Q.; Peng, K.; Yu, Y.; Ruan, X.; Wei, Y. One-pot synthesis of highly fluorescent silicon nanoparticles for sensitive and selective detection of hemoglobin. *Electrophoresis* **2019**, *40*, 2129–2134. [[CrossRef](#)]





1 Article

2 Carbon dots as sensing layer for printed humidity 3 and temperature sensors

4 Almudena Rivadeneyra^{*1}, José F Salmeron¹, Fabio Murru², Markus Becherer³, Luis Fermin
5 Capitan-Vallvey², Diego P Morales¹, Alfonso Salinas-Castillo^{*2}

7 ¹ Department of Analytical Chemistry, University of Granada, Granada, Spain. E-mail: arivadeneyra@ugr.es;
8 jfsalmeron@ugr.es; diegopm@ugr.es

9 ² Department of Electronics and Computer Technology, University of Granada, Granada, Spain. E-mail:
10 fmurru@correo.ugr.es; lcapitan@ugr.es; alfonsos@ugr.es

11 ³ Institute for Nanoelectronics, Technical University of Munich, Munich, Germany. E-mail:
12 markus.becherer@tum.de

14 * Correspondence: arivadeneyra@ugr.es; Tel.:+34-958248996 (A.R.) alfonsos@ugr.es; Tel.:+34958243326
15 (A.S.C.)

16 Received: date; Accepted: date; Published: date

17 **Abstract:** This work present an innovative application of Carbon dots (Cdots) nanoparticles as
18 sensing layer for relative humidity detection. The developed sensor is based on interdigitated
19 capacitive electrodes screen printed on a flexible transparent (polyeth)ylene ter(ephthalate) (PET)
20 film. Cdots are deposited on top of these electrodes. An exhaustive characterization of the
21 nanoparticles has been conducted along with the fabrication of the sensor structure. The
22 accompanied experiments give all the sensibility to the Cdots, showing its dependence with
23 temperature and exciting frequency. To the best of our knowledge, this work pave the path to the
24 use of these kind of nanoparticles in printed flexible capacitive sensors aimed to be employed in the
25 continuously expanding Internet of Things ecosystem.

26 **Keywords:** capacitive sensors; moisture content; nanomaterials; screen printing; printed electronics
27

28 1. Introduction

29 The increasing demand in sensors and actuators in the last decades has motivated the research
30 of new sensing materials, which fulfil the desired requirements such as cost-effective materials, high
31 sensitivity and high selectivity to the parameter of interest, among other characteristics [1].
32 Furthermore, though the sensing material improvement is of principal interest not least is the
33 selection of the substrate that supports it. This selection determines the integration of the sensor with
34 the environment where the magnitude to measure must be acquired. Ideally, the inclusion of sensor
35 systems must be transparent to the controlled processes and above all, it should not influence the
36 design of the process or system to be controlled.

37 In this context, the development of relative humidity (RH) sensors attracted considerable
38 attention given their importance for various processes in the food industry and industrial processes
39 [2-5]. In particular, the interdigitated electrode (IDE) has been extensively investigated to detect
40 capacitive humidity sensors [6-8]. Many materials have been used to manufacture flexible relative
41 humidity sensors in IDE systems, such as carbon nanotubes (CNTs) [9], metal and organic
42 frameworks (MOFs) [10] and different polymers or oxides [11-13].

43 In this sense, nanomaterials (metal nanoparticles, semiconductor quantum dots, carbon dots,
44 nanotubes, and nanocrystals) can be used as novel sensing elements and they allow us to build

45 devices much smaller than before. There are many examples in the literature where this kind of
46 materials is employed for different sensing applications. For example, CNTs and graphene derivatives
47 have been utilized for gas [14-16], temperature [17,18] and relative humidity (RH) sensing [12,19].
48 They offer high sensitivity and flexibility to the sensor but they lack of selectivity: they response to
49 almost everything [20]. Other wide use nanomaterials are metal nanoparticles, which have used for
50 not only electrodes [21] but also together with CNTs to tune their selectivity [22,23]. Recently, new
51 nanoparticles called Carbon dots have emerged and attracted growing interest in chemistry physics
52 and materials science. Carbon dots (Cdots) exhibit excellent properties, which included aqueous
53 solubility, good electronic conductivity, low toxicity and biocompatibility [24]. They can be
54 synthesised using a simple, cost-effective and environmentally friendly method at large scale.
55 Although these Cdots-based materials hold great promise in bioimaging, drug delivery, sensors,
56 photocatalysis and optoelectronics [25], much work is still necessary to explore the full potentials of
57 these nanomaterials in the development of advanced smart sensors, new avenue for creating simple,
58 selective, and non-invasive real-time analysis, as they can satisfy the growing demand for rapid and
59 cost-effective quantitation [26].

60 In this work, we demonstrate the potential use of Cdots as sensing layer for capacitive RH and
61 temperature sensors. The designed sensors are manufactured on a flexible substrate by means of
62 printed electronics (PE), which allows its integration in almost any device or artefact, enabling its
63 pervasiveness (understood as the ability to be integrated into any element of the environment), and
64 a desired feature for the well-known Internet of Things (IoT) ecosystem. Indeed, thanks to PE, the
65 sensors fulfil most of the desired features of the IoT paradigm, where each physical entity can be
66 connected to its environment and share parameters of its surroundings and self-status, and
67 therefore, they will contain more than one sensor. For these huge amount of needed devices, it is
68 expected by 2020 to have more than 75 billion connected things [1,27], it is mandatory to achieve a
69 cost-effective and large-scale manufacturing. Moreover, other desirable features are conformability
70 (for adapting the electronics to the surfaces shapes) and environmental friendliness (for the
71 reduction of generated wastes during the whole product life). All these features can be achieved by
72 using PE [28,29]. The sensor described in this work corresponds to such devices incorporating a
73 novel sensing element: a Cdots-based layer. It is the first time that their electrical properties towards
74 environmental conditions have been explored to the best of our knowledge. We have also performed
75 such analysis over frequency in order to gain a better insight of its response and try to exploit it
76 better as in previous works [9,30].

77 The exhaustive presentation of the work introduced in this section is structured in the following
78 sections. Section 2 presents all de materials and methods used for developing the RH sensor: from
79 the tools and instruments for the synthesis of the Carbon Dots to the fabrication and deposition
80 technologies for the interdigitated electrode (IDE) capacitive sensor. The document continues in
81 Section 3 showing the results obtained from de devices under test (DUT), describing the conducted
82 experiments. A detailed discussion of these results shows the skills of these RH sensors indicating its
83 dependence and behaviour with temperature changes. Finally, Section 4 contains the conclusion of
84 this work where its strengths are remarked

85 **2. Materials and Methods**

86 *2.1 Carbon Dots Synthesis*

87 2.1.1 Synthesis of Carbon dots

88 The Cdots were prepared according to the procedure described by Salinas-Castillo et al. [4, 5].
89 Rapid procedure with a dissolved citric acid and PEI in water, then, it was placed in microwave and
90 heated at 180 °C for 5 min at 850 W potential. The solution was dialyzed using spectra7pro dialysis
91 membrane 1 KDa cut-off. The solution was characterised by several techniques and obtained results
92 agrees with previous reference.

93 2.1.2 Instrumentation

94 Microwave Milestone MicroSYNTH was used for synthesis. XRD were carried out at the Centre of
95 Scientific Instrumentation (University of Granada) on an EA 1108 model Fisons-Carlo Erba analyzer.
96 High-resolution transmission electron microscopy (HR-TEM) images were obtained from a FEI TITAN
97 G2 60–300 field-emission instrument, equipped with a HAADF detector, the samples were prepared at
98 room temperature in air by the deposition of a drop of aqueous solution of CNDs on a commercial 400
99 μm mesh carbon Cu-grid.

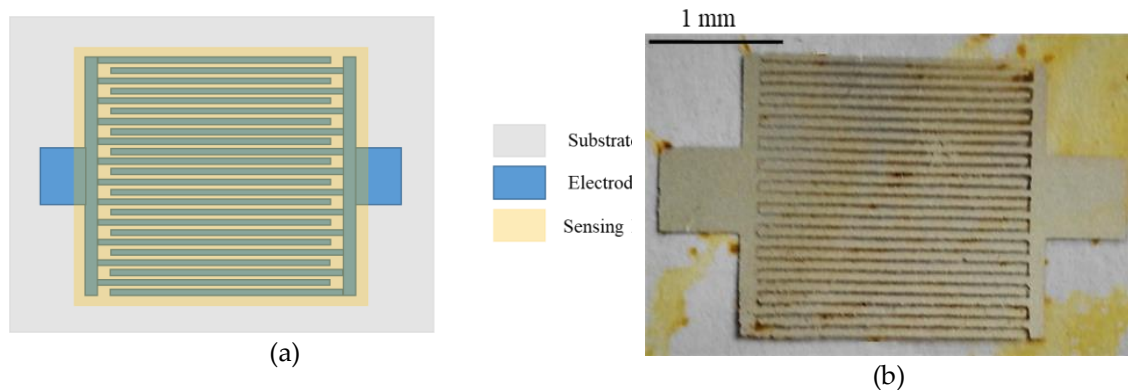
100 Fourier transform infrared (FTIR) spectra were obtained using a PerkinElmer FT-IR Spectrum
101 Two spectrometer. The X-ray diffraction (XRD) was carried out at the Centre of Scientific
102 Instrumentation (University of Granada) on a Fisons-Carlo Erba analyser model EA 1108. X-ray
103 photoelectron spectroscopy (XPS) analyses were carried out at the Centre of Scientific Instrumentation
104 (University of Granada), with a Kratos Axis Ultra-DLD.

105 2.2. Sensor Fabrication

106 The sensors were fabricated on the transparent (polyeth)ylene ter(ephthalate) (PET) film with 125
107 μm . First, the interdigitated electrodes (IDEs) were screen printed with manual screen printer Nino
108 (Coruna Printed Electronics GmbH) using a silver conductive paste (1010 from Loctite). The paste
109 consists of $68 \pm 2\%$ silver particles. The screen mesh density was 165 T/cm. After depositing the
110 electrodes, the samples were dried in an oven (Memmert UF55, Germany) at $60\text{ }^\circ\text{C}$ for 60 min.

111 The NP were dispersed in ethanol and left in ultrasonic bath for 1 h. After that, they were
112 drop-casted onto the electrodes and dried in a hotplate at $60\text{ }^\circ\text{C}$ for 10 min. **Figure 1** depicts a
113 schematic of the sensor and a real picture of the device. The IDE structure is composed by 20 fingers
114 per electrode of 2 mm length and $200\text{ }\mu\text{m}$ width and spacing among consecutive fingers. The resulting
115 thickness is $4.1 \pm 0.6\text{ }\mu\text{m}$. The darker yellowish spots are accumulation of Cdots.

116



117 **Figure 1.** Schematic of the sensor (a) and real picture (b).

118 2.3 Characterization

119 The capacitance measurements were obtained using the E4990A impedance analyzer (from
120 Keysight Technologies, USA) with an impedance probe kit (42941A). The excitation voltage applied
121 was $V_{\text{DC}} = 0$ and $V_{\text{AC}} = 500\text{ mV}$ in all measurements and the frequency ranged from 1 kHz to 10 MHz. A
122 calibration was performed to compensate the parasitic elements, as the one described in [30]. The
123 sensor was placed in a climatic chamber (VCL4006 from Vötsch Industrietechnik GmbH, Germany)
124 with the temperature and humidity control. For the RH sensing, the moisture content was ramped up
125 in 10% steps and held for 1 h to ensure a stable value in the whole chamber volume. A similar
126 approach was followed for the temperature sensing with $5\text{ }^\circ\text{C}$ steps for 30 min. The measurements
127 were automated with the use of LabVIEW 2016.

128 The thickness of the electrodes were measured with a Dektak XTTM Stimulus Surface Profiling
129 System (Bruker Corporation, Coventry, UK).

130 3. Results and Discussion

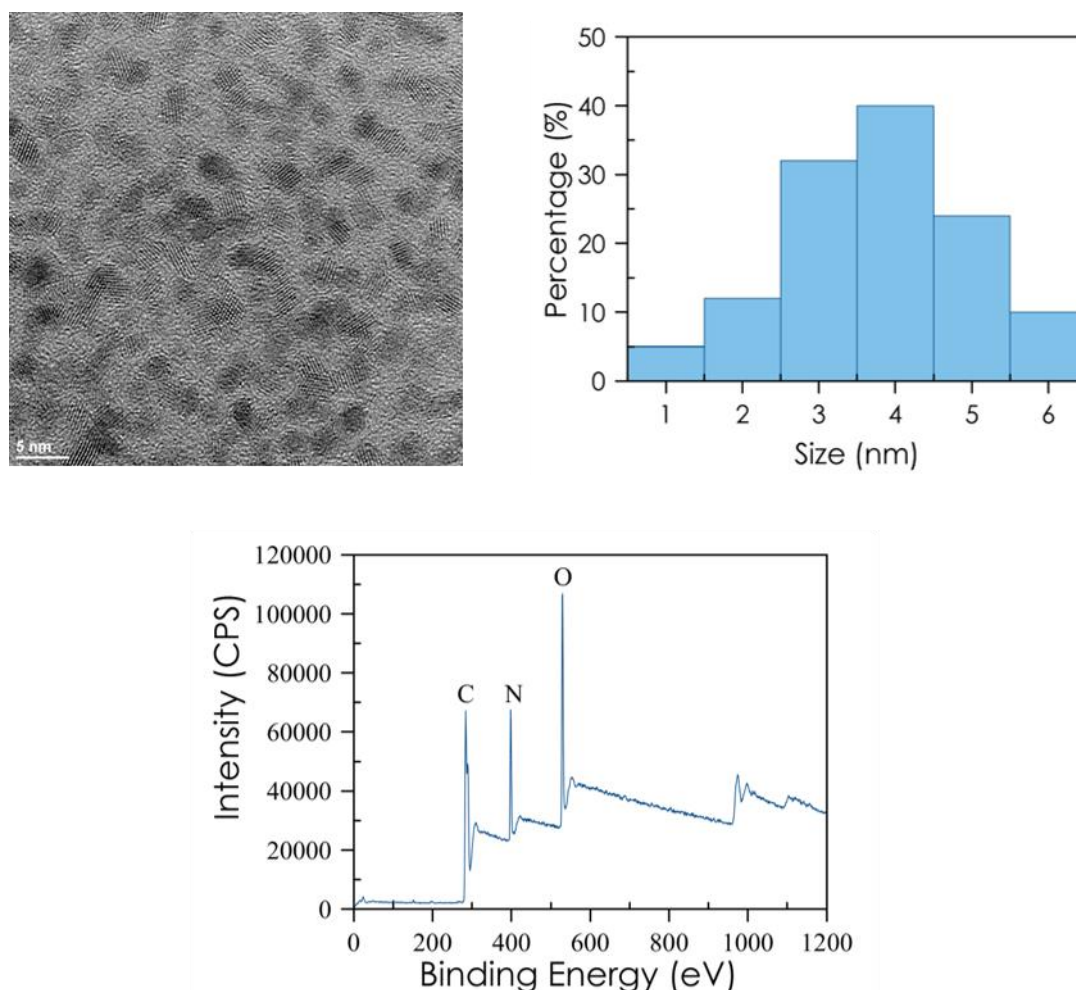
131 This section may be divided by subheadings. It should provide a concise and precise
132 description of the experimental results, their interpretation as well as the experimental conclusions
133 that can be drawn.

134 In this section, we first show the characterization of the Cdots followed by the one of the
135 fabricated device with respect to the moisture content at a fixed temperature. Later, we analyse the
136 effect of temperature at different RH values.

137 3.1 Characterization of Carbon dots

138 The size, morphology and structure of the Cdots were studied by high-resolution HR-TEM,
139 EDX, XPS, FTIR and XRD.

140 The HR-TEM image of Cdots shows that the Cdots are spherical with a low degree of the
141 agglomeration. The particle size distribution histogram is presented in **Figure 2a**. The size of CDs
142 is distributed in narrow range of 1-6 nm with an average particle size of 4 nm, see **Figure 2b**. Elemental
143 analysis by EDX were performed to know the composition of Cdots, shows that C, N and O atoms
144 are present on the composition of Cdots.
145



146

147 **Figure 2.** Characterization of the CDs. (a) HR-TEM image; (b) Size distribution for CDs; (c) XPS
148 spectra: C_{1s} peak: 284 eV; N_{1s} peak: 398 eV and O_{1s} peak: 530.

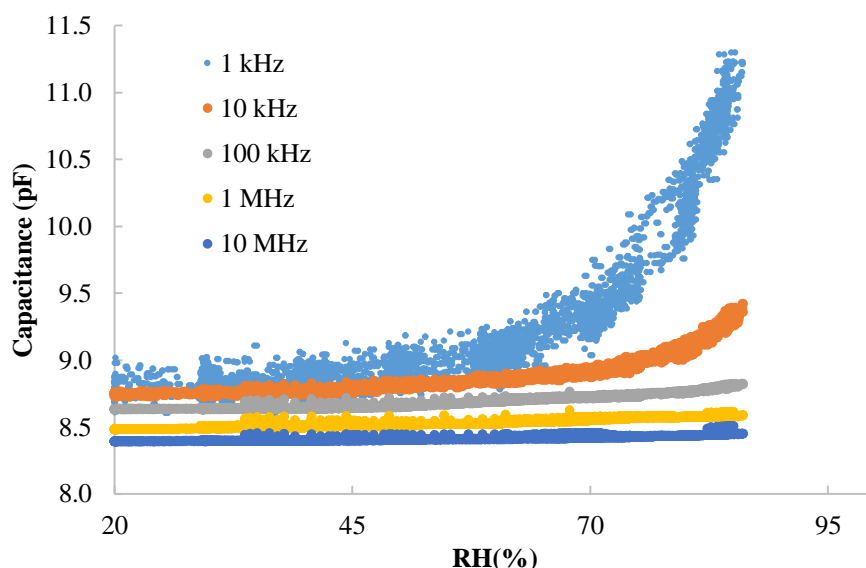
149 The FTIR spectrum of Cdots showed typical bands (COOH of 3440 cm⁻¹, NH of 1585 cm⁻¹, CH
150 of 2950 and 2820 cm⁻¹, CN of 1122 cm⁻¹). Furthermore, the elemental composition of the Cdots was
151 performed by XPS surface analysis (Figure 2c). As expected, the obtained data for the elemental
152 composition of Cdots indicate the presence of a carbon peak at about 284 eV, an oxygen peak at

153 about 530 eV and a nitrogen peak at about 398 eV. Additionally, the atomic quantification shows
154 69.37% C1s, 16.62% O1s and 14.02% N1s atoms. XRD pattern had a broad diffraction peak at
155 $2\Phi = 20.5^\circ$, suggesting an amorphous material.

156 3.2 Response to RH

157 Before depositing the sensing layer, we measured a capacitive value of about 4 pF at 100 kHz at
158 room conditions. We also characterized the silver electrodes on PET with the same RH swept and
159 there was virtually no change in the capacitance over the frequency range selected (less than 3% in
160 the whole range) [31]. Therefore, any variation in the response with respect to moisture content can
161 be attributed to a change in the sensing layer.

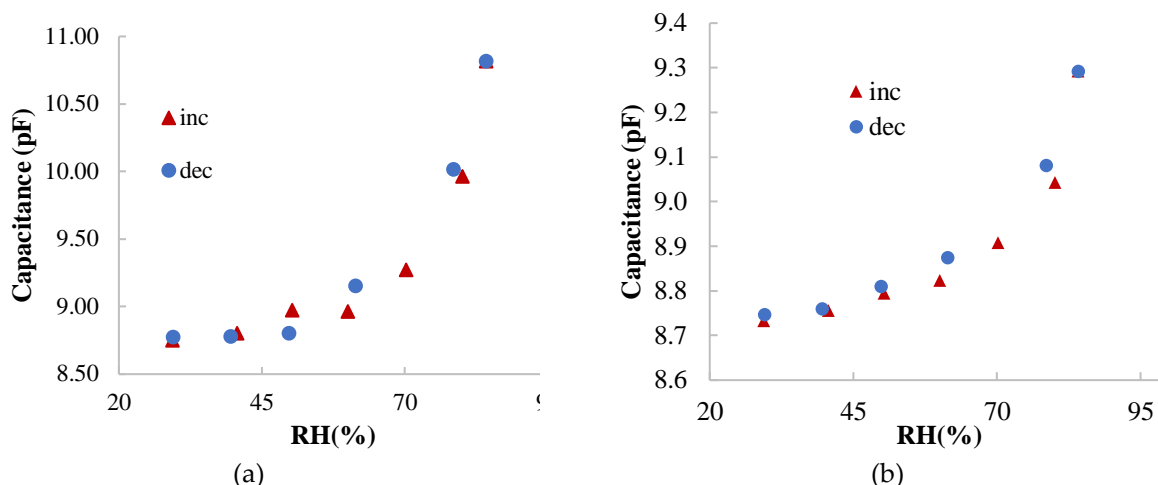
162 Figure 3 present the response of the DUT (Device Under Test) towards RH at different
163 frequencies. The DUT shows a capacitive behaviour with about 8.8 pF measured at 100 kHz and
164 room conditions. The highest response to RH is found at the lowest frequency. Above 100 kHz the
165 capacitance changes less than 100 fF. Therefore, we have analysed the response at 1 kHz and 10 kHz
166 (see Figure 4). In terms of absolute response, the capacitance varies 2 pF at 1 kHz and 0.6 pF at 10
167 kHz from 20% to 85%RH. In terms of linearity, the response at 10 kHz shows a coefficient of linear
168 regression above 0.84 while the fitting curve at 1 kHz has a coefficient of linear regression below
169 0.73. With respect to the hysteresis, the maximum error between the data recorded increasing and
170 decreasing RH is about 200 fF at 1 kHz and about 50 fF at 10 kHz. In both cases, the maximum error
171 happens at 60%RH.



172

173 **Figure 3.** Capacitance vs. RH at different frequencies and 40°C.

174 Looking at the calibration curves, they could be better fitted by two lines, one covering from
175 20%RH to 55%RH and the other fitting line for higher RH values, see Table 1. In fact, the sensitivity
176 above 55%RH is one order of magnitude higher than at low RH values. In the case of the curves for
177 higher RH values, the sensitivity is about 70 fF/%RH and 17 fF/%RH at 1 kHz and 10 kHz,
178 respectively.



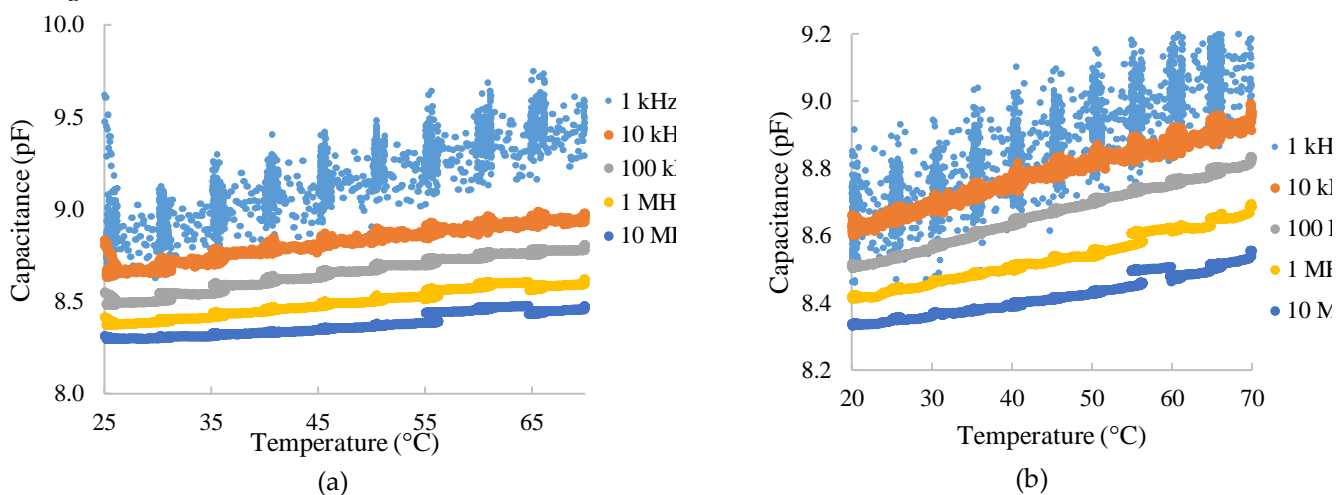
179 **Figure 4.** Calibration curves increasing and decreasing RH at 1 kHz (a) and 10 kHz (b).

180 **Table 1.** Calibration curves extracted from Figure 4.

Freq.	RH<55%	RH>55%
1 kHz	$C(\text{pF})=0.0047 \cdot \text{RH}(\%) + 8.6162$ $R^2=0.9579$	$C(\text{pF})=0.0696 \cdot \text{RH}(\%) + 4.9399$ $R^2=0.9050$
10 kHz	$C(\text{pF})=0.0028 \cdot \text{RH}(\%) + 8.6542$ $R^2=0.9468$	$C(\text{pF})=0.0169 \cdot \text{RH}(\%) + 7.7843$ $R^2=0.8995$

181 **3.3 Response to Temperature**

182 The most interfering factor in humidity sensor is temperature. In this sense, we have analysed
 183 its influence in our DUT, varying the temperature from 20 to 70°C. **Error! Not a valid bookmark
 184 self-reference.** shows the capacitance over temperature for different frequencies at 60%RH (**Error!
 185 Not a valid bookmark self-reference.**a) and 40%RH (**Error! Not a valid bookmark self-reference.**b).
 186 It can be seen how there is a significant thermal drift in both cases, although it is slighter lower at
 187 higher RH values.



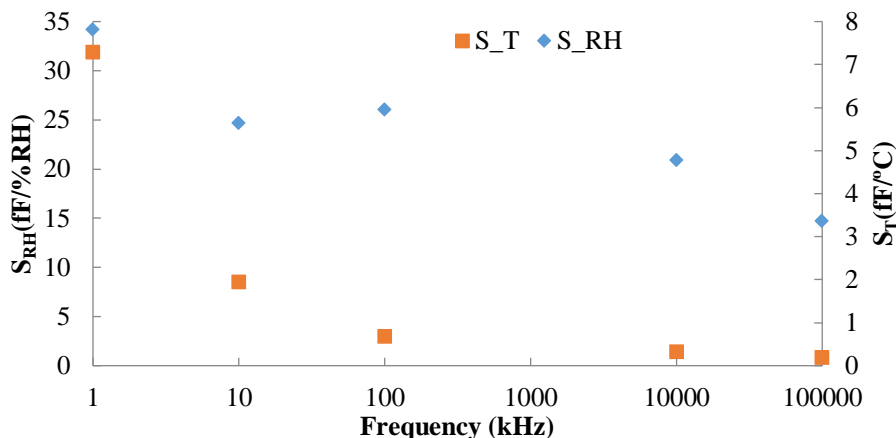
188 **Figure 5.** Capacitance vs. Temperature at different frequencies and (a) 60%RH and (b) 40%RH.

189 Finally, we have calculated the sensitivity to RH and the thermal drift of the sensor at the
 190 different frequencies, S_{RH} and $S_T(f)$, respectively using Eq. 1 and 2.

$$S_{RH} = \frac{\partial C_{T=\text{cte}}(RH)}{\partial RH} \tag{1}$$

$$S_T = \frac{\partial C_{RH=cte}(T)}{\partial RH} \quad (2)$$

191 Figure 6 presents the calculated sensitivities. The dependency with respect RH is 4 times higher
 192 at 1 kHz and 1.5 times at 10 kHz than the one to temperature whereas at higher frequencies there is
 193 almost no dependency towards RH but the thermal drift cannot be neglected (even at 10 MHz the
 194 variation is more than 3 fF/°C). This could be exploited as self-thermal compensated RH sensor by
 195 measuring at higher frequencies (above 1 MHz) the temperature value and using it to compensate
 196 the RH value obtained at lower frequencies (below 100 kHz).



197

198

Figure 6. Sensitivity to RH (at 40 °C) and thermal (at 60%RH) sensitivity over frequency.

199

4. Conclusions

200

Carbon dots materials have been studied for sensing devices implementations in IDE for their use for capacitive humidity sensors. Furthermore, the sensor is fabricated by printing techniques on a flexible substrate, providing more interesting features, such as pervasiveness, light-weight and cost-effective devices.

204

The fabricated devices show a capacitive behavior with about 8.7 pF measured at 100 kHz and room conditions. The highest response is found at the lowest frequency. Above 100 kHz the capacitance changes less than 100 fF. In terms of absolute response, the capacitance varies 2 pF at 1 kHz and 0.6 pF at 10 kHz from 20% to 90%RH.

208

The electrical characteristics of Cdots for the development of printed sensors has been presented. Cdots can be used as sensing layer in this kind of devices, although an exhaustive characterization on frequency is mandatory. Moreover, from this study, a method of temperature compensation could be used without tending an extra temperature sensor: self-compensated humidity sensor. To achieve that, temperature will be measured at frequencies above 1 MHz, and this reading of the temperature will be employed to compensate the RH value obtained at frequencies below 100 kHz.

215

216

Author Contributions: Conceptualization, A.S.C. and D.P.M.; methodology, A.R.; investigation, F.M. and J.F.S.; resources, M.B.; writing—original draft preparation, A.R.; writing—review and editing, D.P.M.; supervision, L.F.C.V. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

219

Almudena Rivadeneyra*1, José F Salmeron1, Fabio Murru2, Markus Becherer3, Luis Fermin Capitan-Vallvey2, Diego P Morales1, Alfonso Salinas-Castillo*2

220

221

Funding: This work has been supported by the European Commission through the fellowship H2020-MSCA-IF-2017-794885-SELFSENS.

222

223

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

224

References

- 225 1. Sullivan, F. Global humidity and moisture sensors market forecast to 2023, industry analysis, market
226 share & size. https://www.researchandmarkets.com/research/2bv5z2/global_humidity (14/11/2019),
227 2. Bridgeman, D.; Corral, J.; Quach, A.; Xian, X.; Forzani, E. Colorimetric humidity sensor based on liquid
228 composite materials for the monitoring of food and pharmaceuticals. *Langmuir* **2014**, *30*, 10785-10791.
229 3. Bibi, F.; Guillaume, C.; Gontard, N.; Sorli, B. A review: Rfid technology having sensing aptitudes for
230 food industry and their contribution to tracking and monitoring of food products. *Trends in Food*
231 *Science & Technology* **2017**, *62*, 91-103.
232 4. Trung, T.Q.; Ramasundaram, S.; Lee, N.-E. Transparent, stretchable, and rapid-response humidity
233 sensor for body-attachable wearable electronics. *Nano Research* **2017**, *10*, 2021-2033.
234 5. Salvo, P.; Di Francesco, F.; Costanzo, D.; Ferrari, C.; Trivella, M.G.; De Rossi, D. A wearable sensor for
235 measuring sweat rate. *IEEE Sensors Journal* **2010**, *10*, 1557-1558.
236 6. Kang, U.; Wise, K.D. A high-speed capacitive humidity sensor with on-chip thermal reset. *IEEE*
237 *Transactions on Electron Devices* **2000**, *47*, 702-710.
238 7. Kim, J.-H.; Hong, S.-M.; Moon, B.-M.; Kim, K. High-performance capacitive humidity sensor with
239 novel electrode and polyimide layer based on mems technology. *Microsystem technologies* **2010**, *16*,
240 2017-2021.
241 8. Tetelin, A.; Pellet, C. Modeling and optimization of a fast response capacitive humidity sensor. *IEEE*
242 *Sensors Journal* **2006**, *6*, 714-720.
243 9. Falco, A.; Loghin, F.C.; Becherer, M.; Lugli, P.; Salmerón, J.F.; Rivadeneyra, A. Low-cost gas sensing:
244 Dynamic self-compensation of humidity in cnt-based devices. *ACS sensors* **2019**, *4*, 3141-3146.
245 10. Seco, J.M.; San Sebastián, E.; Cepeda, J.; Biel, B.; Salinas-Castillo, A.; Fernández, B.; Morales, D.P.;
246 Bobinger, M.; Gómez-Ruiz, S.; Loghin, F.C. A potassium metal-organic framework based on
247 perylene-3, 4, 9, 10-tetracarboxylate as sensing layer for humidity actuators. *Scientific reports* **2018**, *8*,
248 1-10.
249 11. Rivadeneyra, A.; Fernández-Salmerón, J.; Agudo-Acemel, M.; López-Villanueva, J.A.;
250 Capitán-Vallvey, L.F.; Palma, A.J. Hybrid printed device for simultaneous vapors sensing. *IEEE*
251 *Sensors Journal* **2016**, *16*, 8501-8508.
252 12. Borini, S.; White, R.; Wei, D.; Astley, M.; Haque, S.; Spigone, E.; Harris, N.; Kivioja, J.; Ryhanen, T.
253 Ultrafast graphene oxide humidity sensors. *ACS nano* **2013**, *7*, 11166-11173.
254 13. Bi, H.; Yin, K.; Xie, X.; Ji, J.; Wan, S.; Sun, L.; Terrones, M.; Dresselhaus, M.S. Ultrahigh humidity
255 sensitivity of graphene oxide. *Scientific reports* **2013**, *3*, 1-7.
256 14. Schütt, F.; Postica, V.; Adelung, R.; Lupan, O. Single and networked zno-cnt hybrid tetrapods for
257 selective room-temperature high-performance ammonia sensors. *ACS Applied Materials & Interfaces*
258 **2017**, *9*, 23107-23118.
259 15. Abdulla, S.; Mathew, T.L.; Pullithadathil, B. Highly sensitive, room temperature gas sensor based on
260 polyaniline-multiwalled carbon nanotubes (pani/mwcnts) nanocomposite for trace-level ammonia
261 detection. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2015**, *221*, 1523-1534.
262 16. Young, S.-J.; Lin, Z.-D. Sensing performance of carbon dioxide gas sensors with carbon nanotubes on
263 plastic substrate. *ECS Journal of Solid State Science and Technology* **2017**, *6*, M72-M74.
264 17. Cagatay, E.; Falco, A.; Abdellah, A.; Lugli, P. In *Carbon nanotube based temperature sensors fabricated by*
265 *large-scale spray deposition*, Microelectronics and Electronics (PRIME), 2014 10th Conference on Ph. D.
266 Research in, 2014; IEEE: pp 1-4.

- 267 18. Romero, F.; Salinas-Castillo, A.; Rivadeneyra, A.; Albrecht, A.; Godoy, A.; Morales, D.P.; Rodriguez, N.
268 In-depth study of laser ablation of kapton polyimide for flexible conductive substrates. **2018**.
- 269 19. Jung, D.; Kim, J.; Lee, G.S. Enhanced humidity-sensing response of metal oxide coated carbon
270 nanotube. *Sensors and Actuators A: Physical* **2015**, *223*, 11-17.
- 271 20. Star, A.; Joshi, V.; Skarupo, S.; Thomas, D.; Gabriel, J.-C.P. Gas sensor array based on metal-decorated
272 carbon nanotubes. *The Journal of Physical Chemistry B* **2006**, *110*, 21014-21020.
- 273 21. Rivadeneyra, A.; Fernández-Salmerón, J.; Agudo-Acemel, M.; López-Villanueva, J.A.;
274 Capitan-Vallvey, L.F.; Palma, A.J. Printed electrodes structures as capacitive humidity sensors: A
275 comparison. *Sensors and Actuators A: Physical* **2016**, *244*, 56-65.
- 276 22. Abdelhalim, A.; Winkler, M.; Loghin, F.; Zeiser, C.; Lugli, P.; Abdellah, A. Highly sensitive and
277 selective carbon nanotube-based gas sensor arrays functionalized with different metallic
278 nanoparticles. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2015**, *220*, 1288-1296.
- 279 23. Abdelhalim, A.; Abdellah, A.; Scarpa, G.; Lugli, P. Metallic nanoparticles functionalizing carbon
280 nanotube networks for gas sensing applications. *Nanotechnology* **2014**, *25*, 055208.
- 281 24. Liu, W.; Li, C.; Ren, Y.; Sun, X.; Pan, W.; Li, Y.; Wang, J.; Wang, W. Carbon dots: Surface engineering
282 and applications. *Journal of Materials Chemistry B* **2016**, *4*, 5772-5788.
- 283 25. Xi, N.; Lai, K. *Nano optoelectronic sensors and devices: Nanophotonics from design to manufacturing*. William
284 Andrew: 2011.
- 285 26. Gao, J.; Zhu, M.; Huang, H.; Liu, Y.; Kang, Z. Advances, challenges and promises of carbon dots.
286 *Inorganic Chemistry Frontiers* **2017**, *4*, 1963-1986.
- 287 27. Columbus, L. Roundup of internet of things forecasts and market estimates, 2016.
288 [https://www.forbes.com/sites/louiscolumbus/2016/11/27/roundup-of-internet-of-things-forecasts-and-](https://www.forbes.com/sites/louiscolumbus/2016/11/27/roundup-of-internet-of-things-forecasts-and-market-estimates-2016/#75dee127292d)
289 [market-estimates-2016/#75dee127292d](https://www.forbes.com/sites/louiscolumbus/2016/11/27/roundup-of-internet-of-things-forecasts-and-market-estimates-2016/#75dee127292d)
- 290 28. Suganuma, K. *Introduction to printed electronics*. Springer Science & Business Media: 2014; Vol. 74.
- 291 29. Mattana, G.; Briand, D. Recent advances in printed sensors on foil. *Materials Today* **2016**, *19*, 88-99.
- 292 30. Rivadeneyra, A.; Fernández-Salmerón, J.; Agudo, M.; López-Villanueva, J.; Capitan-Vallvey, L.; Palma,
293 A. Design and characterization of a low thermal drift capacitive humidity sensor by inkjet-printing.
294 *Sensors and Actuators B: Chemical* **2014**, *195*, 123-131.
- 295 31. Rivadeneyra, A.; Salmerón, J.F.; Agudo-Acemel, M.; Capitan-Vallvey, L.F.; López-Villanueva, J.A.;
296 Palma, A.J. Asymmetric enhanced surface interdigitated electrode capacitor with two out-of-plane
297 electrodes. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2018**, *254*, 588-596.
- 298



© 2020 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



DOCUMENTO DE ACTIVIDADES DEL DOCTORANDO

REGULADO POR RD99/2011 Y NORMATIVA UGR C.G.

(Aprobado en Consejo de Gobierno de 2 de mayo de 2012 y modificado en Consejo de Gobierno de 30 de octubre de 2013)

DOCTORANDO

Exp: 62856

<u>DNI / NIE / PASAPORTE</u>	<u>NOMBRE</u>	<u>APELLIDOS</u>
AX7683787	FABIO	MURRU

PROGRAMA DE DOCTORADO DONDE ESTÁ MATRICULADO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN QUÍMICA

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN EN LA QUE ESTÁ MATRICULADO

METODOLOGÍAS DE OBTENCIÓN DE INFORMACIÓN ANALÍTICA EN SISTEMAS REALES

DOCUMENTO DE ACTIVIDADES DEL DOCTORANDO

DETALLE DE LA ACTIVIDAD N.º 1

<u>INSTITUCIÓN DONDE SE REALIZÓ</u>	<u>TIPO INSTITUCIÓN</u>	<u>CENTRO</u>	<u>PAÍS</u>
Academia de Ciencias Matemáticas, Físico-Químicas y Naturales de Granada	Universidad	Facultad de Ciencias (Salón de Grados)	ESPAÑA
<u>TÍTULO</u> Asistencia a cursos, seminarios o conferencias			
<u>DESCRIPCIÓN</u> Conferencia Avelino Corma			
<u>FECHA INICIO</u>	<u>FECHA FIN</u>	<u>Nº DE HORAS</u>	<u>VALORACIÓN DEL TUTOR</u>
16-01-2015	16-01-2015	-	Excelente. Conferencia de caracter general que permite ampliar la vision y actualizacion de la quimica.

DETALLE DE LA ACTIVIDAD N.º 2

<u>INSTITUCIÓN DONDE SE REALIZÓ</u>	<u>TIPO INSTITUCIÓN</u>	<u>CENTRO</u>	<u>PAÍS</u>
UGR	Universidad	Facultad de Ciencias (Salón de Grados)	ESPAÑA
<u>TÍTULO</u> Asistencia a cursos, seminarios o conferencias			
<u>DESCRIPCIÓN</u> Conferencia Prof. Sanchez Ron sobre evolucion de Fisica			
<u>FECHA INICIO</u>	<u>FECHA FIN</u>	<u>Nº DE HORAS</u>	<u>VALORACIÓN DEL TUTOR</u>
28-04-2015	28-04-2015	-	Excelente. Interesante para la formacion global del doctorando en el campo cientifico.

DETALLE DE LA ACTIVIDAD N.º 3

<u>INSTITUCIÓN DONDE SE REALIZÓ</u>	<u>TIPO INSTITUCIÓN</u>	<u>CENTRO</u>	<u>PAÍS</u>
Centro de Transferencia Tecnológica (CTT) y Facultad de Ciencias de la UGR	Universidad	UGR, OTRI, Junta de Andalucía y Comunidad Europea	ESPAÑA
<u>TÍTULO</u> CURSO: "RUTA EMPRENDEDORA"			
<u>DESCRIPCIÓN</u> Es una actividad de interes general para el doctorando			
<u>FECHA INICIO</u>	<u>FECHA FIN</u>	<u>Nº DE HORAS</u>	<u>VALORACIÓN DEL TUTOR</u>
06-03-2015	24-04-2015	-	Excelente. Es una actividad general de formacion que hay de gran aprovechamiento

DETALLE DE LA ACTIVIDAD N.º 4

<u>INSTITUCIÓN DONDE SE REALIZÓ</u>	<u>TIPO INSTITUCIÓN</u>	<u>CENTRO</u>	<u>PAÍS</u>
Seminario I, 4ª planta, E.T.S Ing. Caminos, C. y P., Campus de Fuentenueva (UGR)	Universidad	Programa Oficial de Doctorado en Ingeniería Civil y Máster Universitario en Estructuras (UGR)	ESPAÑA
<u>TÍTULO</u> Asistencia a cursos, seminarios o conferencias			
<u>DESCRIPCIÓN</u> La conferencia Treatment Planning for High Intensity Focused Ultrasound (HIFU) ablation of tumours es interesante para su formación general.			
<u>FECHA INICIO</u>	<u>FECHA FIN</u>	<u>Nº DE HORAS</u>	<u>VALORACIÓN DEL TUTOR</u>
03-07-2015	03-07-2015	-	Excelente. Ha aprovechado adecuadamente la actividad formativa

DETALLE DE LA ACTIVIDAD N.º 5

<u>INSTITUCIÓN DONDE SE REALIZÓ</u>	<u>TIPO INSTITUCIÓN</u>	<u>CENTRO</u>	<u>PAÍS</u>
Salón de Grados (Facultad de Ciencias)	Universidad	Escuela de Doctorado de Ciencias de la Salud	ESPAÑA
<u>TÍTULO</u> Asistencia a cursos, seminarios o conferencias			
<u>DESCRIPCIÓN</u> La conferencia Acciones Marie Sklodowska-Curie: Oportunidades para la movilidad en investigación es de interes para su formación y perspectivas de futuro.			
<u>FECHA INICIO</u>	<u>FECHA FIN</u>	<u>Nº DE HORAS</u>	<u>VALORACIÓN DEL TUTOR</u>
07-07-2015	07-07-2015	-	Excelente. Esta actividad ha sido de tipo muy general y le hamostrado diferentes posibilidades de ayudas para investigadores

DETALLE DE LA ACTIVIDAD N.º 6

<u>INSTITUCIÓN DONDE SE REALIZÓ</u>	<u>TIPO INSTITUCIÓN</u>	<u>CENTRO</u>	<u>PAÍS</u>
Salón de Grados (Facultad de Ciencias, UGR)	Universidad	Academia de Ciencias Matemáticas, Físico-Químicas y Naturales de Granada; Asociación de Jóvenes Investigadores (ASI-Granada)	ESPAÑA
<u>TÍTULO</u> Asistencia a cursos, seminarios o conferencias			
<u>DESCRIPCIÓN</u> Mesa redonda sobre la situacionde la investigacion en España			
<u>FECHA INICIO</u>	<u>FECHA FIN</u>	<u>Nº DE HORAS</u>	<u>VALORACIÓN DEL TUTOR</u>
23-10-2015	23-10-2015	-	Excelente. La tematica de esta mesa redonda es de gran interes para futuros investigadores y creo que la ha aprovechado.

DETALLE DE LA ACTIVIDAD N.º 7

<u>INSTITUCIÓN DONDE SE REALIZÓ</u>	<u>TIPO INSTITUCIÓN</u>	<u>CENTRO</u>	<u>PAÍS</u>
Salón de Grados	Universidad	Facultad de Ciencias	ESPAÑA
<u>TÍTULO</u> Asistencia a cursos, seminarios o conferencias			
<u>DESCRIPCIÓN</u> II JORNADAS SOBRE CIENCIA, TRANSFERENCIA DEL CONOCIMIENTO Y SOCIEDAD organizadas por la Academia de Ciencias junto con la OTRI y la Facultad de Ciencias			
<u>FECHA INICIO</u>	<u>FECHA FIN</u>	<u>Nº DE HORAS</u>	<u>VALORACIÓN DEL TUTOR</u>
03-11-2015	09-12-2015	-	Excelente. Se valora positivamente por la vision amplia que ha aportado al alumno.

DETALLE DE LA ACTIVIDAD N.º 8

<u>INSTITUCIÓN DONDE SE REALIZÓ</u>	<u>TIPO INSTITUCIÓN</u>	<u>CENTRO</u>	<u>PAÍS</u>
Sala de Conferencias, Edificio Mecenas	Universidad	Departamentos de Química Inorgánica y Orgánica y Doctorado en Química	ESPAÑA
<u>TÍTULO</u> Asistencia a cursos, seminarios o conferencias			
<u>DESCRIPCIÓN</u> Conferencia "Metal Organic Frameworks as platforms for the design of heterogeneous catalysts" del Prof. Jorge Gascón, Universidad de Delft por su interes en el tema de investigacion que se esta desarrollando.			
<u>FECHA INICIO</u>	<u>FECHA FIN</u>	<u>Nº DE HORAS</u>	<u>VALORACIÓN DEL TUTOR</u>
22-01-2016	22-01-2016	-	Excelente. Actividad de interes por estar en relacion con materiales que se estan usando en investigacion en el grupo.

DETALLE DE LA ACTIVIDAD N.º 9

<u>INSTITUCIÓN DONDE SE REALIZÓ</u>	<u>TIPO INSTITUCIÓN</u>	<u>CENTRO</u>	<u>PAÍS</u>
Salón de Grados (Facultad de Ciencias)	Universidad	Programa de Doctorado en Química, Departamento de Química Inorgánica y Facultad de Ciencias	ESPAÑA
<u>TÍTULO</u> Asistencia a cursos, seminarios o conferencias			
<u>DESCRIPCIÓN</u> Síntesis, caracterización y funcionalización selectiva de nanoestructuras metálicas, aplicaciones en biomedicina y medio ambiente " Profa. Alma Gabriela Palestino Escobedo, Universidad de San Luis Potosí. Es una conferencia interesante en el contexto de su proyecto de doctorado			
<u>FECHA INICIO</u>	<u>FECHA FIN</u>	<u>Nº DE HORAS</u>	<u>VALORACIÓN DEL TUTOR</u>
27-01-2016	27-01-2016	-	Excelente. Es una actividad formativa interesante por estar relacionada con materiales usados por el grupo de investigación.

DETALLE DE LA ACTIVIDAD N.º 10

<u>INSTITUCIÓN DONDE SE REALIZÓ</u>	<u>TIPO INSTITUCIÓN</u>	<u>CENTRO</u>	<u>PAÍS</u>
Nanomaterials	Universidad	Grupo ECsens (Departamentos de Química Analítica y Electrónica y Tecnología de los Computadores) y Unidad de Excelencia de Química Aplicada a la Biomedicina y al Medio Ambiente de la UGR	ESPAÑA
<u>TÍTULO</u> Publicación de un trabajo científico en un medio de impacto contrastado			
<u>DESCRIPCIÓN</u> -- OBLIGATORIA --			
<u>FECHA INICIO</u>	<u>FECHA FIN</u>	<u>Nº DE HORAS</u>	<u>VALORACIÓN DEL TUTOR</u>
30-04-2019	26-04-2020	100	Excelente. Publicación de un trabajo sobre la síntesis de carbon dots de tipo fosforescente, caracterización y su uso como reactivo para la determinación de hemoglobina basada en atenuación de luminiscencia. El trabajo se complementa con el desarrollo de una plataforma reconfigurable de medida de luminiscencia y su aplicación a la determinación en sangre. Ha sido publicado en la revista Nanomaterials de la editorial MPDI. Su factor de impacto es de 4.034 y se encuentra en el 1º cuartil 71/293 (Q1) en Materials Science, Multidisciplinary.

DETALLE DE LA ACTIVIDAD N.º 12

<u>INSTITUCIÓN DONDE SE REALIZÓ</u>	<u>TIPO INSTITUCIÓN</u>	<u>CENTRO</u>	<u>PAÍS</u>
Antigua Facultad de Medicina (Avenida de Madrid 11)	Universidad	Consejo de Representantes de Doctorandos, Escuela Internacional de Posgrado, Vicerrectorado de Estudiantes y Empleabilidad	ESPAÑA
<u>TÍTULO</u> Presentación de una comunicación (póster u oral) en un congreso nacional o internacional			
<u>DESCRIPCIÓN</u> Actividad que le servirá para presentar resultados de investigación e interactuar con profesores e investigadores de otros centros.			
<u>FECHA INICIO</u>	<u>FECHA FIN</u>	<u>Nº DE HORAS</u>	<u>VALORACIÓN DEL TUTOR</u>
18-05-2016	20-05-2016	28	Excelente. Ha presentado y defendido muy bien una comunicación sobre la labor de investigación que ha realizado.

DETALLE DE LA ACTIVIDAD N.º 13

<u>INSTITUCIÓN DONDE SE REALIZÓ</u>	<u>TIPO INSTITUCIÓN</u>	<u>CENTRO</u>	<u>PAÍS</u>
Salón de Grados	Universidad	Facultad de Ciencias	ESPAÑA
<u>TÍTULO</u> Asistencia a cursos, seminarios o conferencias			
<u>DESCRIPCIÓN</u> --- Autogenerada por el/la Doctorando/a ---			
<u>FECHA INICIO</u>	<u>FECHA FIN</u>	<u>Nº DE HORAS</u>	<u>VALORACIÓN DEL TUTOR</u>
08-06-2016	08-06-2016	2	Excelente. Se trata de una conferencia interesante sobre un tipo de materiales que se están utilizando en el grupo de investigación.

DETALLE DE LA ACTIVIDAD N.º 14

<u>INSTITUCIÓN DONDE SE REALIZÓ</u>	<u>TIPO INSTITUCIÓN</u>	<u>CENTRO</u>	<u>PAÍS</u>
Salón de Grados (Facultad de Ciencias)	Universidad	Departamento de Química Inorgánica y Doctorado en Química	ESPAÑA
<u>TÍTULO</u> Asistencia a cursos, seminarios o conferencias			
<u>DESCRIPCIÓN</u> --- Autogenerada por ella Doctorando/a ---			
<u>FECHA INICIO</u>	<u>FECHA FIN</u>	<u>Nº DE HORAS</u>	<u>VALORACIÓN DEL TUTOR</u>
24-06-2016	24-06-2016	2	Excelente. .Es de interes la actividad al tener previsto utilizar estos materiales para el desarrollo de sensores quimicos.

DETALLE DE LA ACTIVIDAD N.º 15

<u>INSTITUCIÓN DONDE SE REALIZÓ</u>	<u>TIPO INSTITUCIÓN</u>	<u>CENTRO</u>	<u>PAÍS</u>
Facultad de Ciencias (Aula A12)	Universidad	Programa de Doctorado en Química y Escuela de Posgrado	ESPAÑA
<u>TÍTULO</u> Asistencia a cursos, seminarios o conferencias			
<u>DESCRIPCIÓN</u> --- Autogenerada por ella Doctorando/a ---			
<u>FECHA INICIO</u>	<u>FECHA FIN</u>	<u>Nº DE HORAS</u>	<u>VALORACIÓN DEL TUTOR</u>
11-07-2016	13-07-2016	20	Excelente. .Esta actividad tiene un impacto directo en la formacion del doctorando al trabajar en temas muy proximos.

DETALLE DE LA ACTIVIDAD N.º 16

<u>INSTITUCIÓN DONDE SE REALIZÓ</u>	<u>TIPO INSTITUCIÓN</u>	<u>CENTRO</u>	<u>PAÍS</u>
Salón de Grados de la Facultad de Ciencias	Universidad	Programa de doctorado de Química, Vicerrectorado de Investigación y Departamento de Química Orgánica.	ESPAÑA
<u>TÍTULO</u> Asistencia a cursos, seminarios o conferencias			
<u>DESCRIPCIÓN</u> --- Autogenerada por ella Doctorando/a ---			
<u>FECHA INICIO</u>	<u>FECHA FIN</u>	<u>Nº DE HORAS</u>	<u>VALORACIÓN DEL TUTOR</u>
08-09-2016	08-09-2016	2	Excelente. .La asistencia a actividades de alto nivel tiene un impacto muy positivo en la formacion.

DETALLE DE LA ACTIVIDAD N.º 17

<u>INSTITUCIÓN DONDE SE REALIZÓ</u>	<u>TIPO INSTITUCIÓN</u>	<u>CENTRO</u>	<u>PAÍS</u>
Salón de Grados (Facultad de Ciencias)	Universidad	Facultad de Ciencias; Academia de Ciencias Matemáticas, Físico-Químicas y Naturales de Granada; Real Sociedad Española de Química	ESPAÑA
<u>TÍTULO</u> Asistencia a cursos, seminarios o conferencias			
<u>DESCRIPCIÓN</u> --- Autogenerada por ella Doctorando/a ---			
<u>FECHA INICIO</u>	<u>FECHA FIN</u>	<u>Nº DE HORAS</u>	<u>VALORACIÓN DEL TUTOR</u>
27-09-2016	27-09-2016	1	Excelente. .Conferencia de interés científico y humanístico

DETALLE DE LA ACTIVIDAD N.º 18

<u>INSTITUCIÓN DONDE SE REALIZÓ</u>	<u>TIPO INSTITUCIÓN</u>	<u>CENTRO</u>	<u>PAÍS</u>
Facultad de Ciencias	Universidad	Bruker, Universidad de Granada, Facultad de Ciencias, Sical, Real Sociedad Española de Química, Asociación de Químicos de Andalucía, Grupo Especializado de Jóvenes Investigadores Químicos (Real Sociedad Española de Química)	ESPAÑA
<u>TÍTULO</u> Asistencia a cursos, seminarios o conferencias			
<u>DESCRIPCIÓN</u> --- Autogenerada por ella Doctorando/a ---			
<u>FECHA INICIO</u>	<u>FECHA FIN</u>	<u>Nº DE HORAS</u>	<u>VALORACIÓN DEL TUTOR</u>
03-10-2016	04-10-2016	18	Excelente. .Este congreso ha servido para mejorar sus capacidades de comunicación y la interacción con investigadores de otras áreas.

DETALLE DE LA ACTIVIDAD N.º 19

<u>INSTITUCIÓN DONDE SE REALIZÓ</u>	<u>TIPO INSTITUCIÓN</u>	<u>CENTRO</u>	<u>PAÍS</u>
Salón de Grados (Facultad de Ciencias)	Universidad	Rama de Estudiantes de IEEE de la Universidad de Granada y el Departamento de Electrónica	ESPAÑA
<u>TÍTULO</u>			
Asistencia a cursos, seminarios o conferencias			
<u>DESCRIPCIÓN</u>			
--- Autogenerada por ella Doctorando/a ---			
<u>FECHA INICIO</u>	<u>FECHA FIN</u>	<u>Nº DE HORAS</u>	<u>VALORACIÓN DEL TUTOR</u>
10-01-2017	10-01-2017	2	Excelente. .Conferencia de interes en el contexto de su tema de investigacion.

DETALLE DE LA ACTIVIDAD N.º 20

<u>INSTITUCIÓN DONDE SE REALIZÓ</u>	<u>TIPO INSTITUCIÓN</u>	<u>CENTRO</u>	<u>PAÍS</u>
Salón Actos ETS Ingeniería de Caminos, Canales y Puertos	Universidad	Escuela Internacional de Posgrado	ESPAÑA
<u>TÍTULO</u>			
Asistencia a cursos, seminarios o conferencias			
<u>DESCRIPCIÓN</u>			
--- Autogenerada por ella Doctorando/a ---			
<u>FECHA INICIO</u>	<u>FECHA FIN</u>	<u>Nº DE HORAS</u>	<u>VALORACIÓN DEL TUTOR</u>
07-02-2017	09-02-2017	10	Excelente. .De interes para la formación general del doctorando

DETALLE DE LA ACTIVIDAD N.º 21

<u>INSTITUCIÓN DONDE SE REALIZÓ</u>	<u>TIPO INSTITUCIÓN</u>	<u>CENTRO</u>	<u>PAÍS</u>
Salón de Grado y Hall (Facultad de Ciencias)	Universidad	Universidad de Granada (Vicerrectorado de Investigación y Transferencia, I Plan de Promoción de Investigación). El grupo ECsens figura entre los muchos colaboradores.	ESPAÑA
<u>TÍTULO</u>			
Asistencia a cursos, seminarios o conferencias			
<u>DESCRIPCIÓN</u>			
--- Autogenerada por ella Doctorando/a ---			
<u>FECHA INICIO</u>	<u>FECHA FIN</u>	<u>Nº DE HORAS</u>	<u>VALORACIÓN DEL TUTOR</u>
24-02-2017	24-02-2017	10	Excelente. .De interes por ser una de las lineas de investigacion del grupo

DETALLE DE LA ACTIVIDAD N.º 22

<u>INSTITUCIÓN DONDE SE REALIZÓ</u>	<u>TIPO INSTITUCIÓN</u>	<u>CENTRO</u>	<u>PAÍS</u>
Sala de Audiovisuales (Facultad de Ciencias)	Universidad	Departamento de Química Orgánica y Programa de Doctorado en Química	ESPAÑA
<u>TÍTULO</u>			
Asistencia a cursos, seminarios o conferencias			
<u>DESCRIPCIÓN</u>			
--- Autogenerada por ella Doctorando/a ---			
<u>FECHA INICIO</u>	<u>FECHA FIN</u>	<u>Nº DE HORAS</u>	<u>VALORACIÓN DEL TUTOR</u>
02-03-2017	02-03-2017	2	Excelente. .La actividad es de interes en el contexto de la Unidad de Excelencia de Química.

DETALLE DE LA ACTIVIDAD N.º 23

<u>INSTITUCIÓN DONDE SE REALIZÓ</u>	<u>TIPO INSTITUCIÓN</u>	<u>CENTRO</u>	<u>PAÍS</u>
Sala de Conferencias (Facultad de Ciencias)	Universidad	Programa de Doctorado en Química, Universidad de Granada, Facultad de Ciencias, Departamento de Química Orgánica	ESPAÑA
<u>TÍTULO</u>			
Asistencia a cursos, seminarios o conferencias			
<u>DESCRIPCIÓN</u>			
Bioorthogonal Organometallic Chemistry: Overview, Applications and State-of the-Art			
<u>FECHA INICIO</u>	<u>FECHA FIN</u>	<u>Nº DE HORAS</u>	<u>VALORACIÓN DEL TUTOR</u>
21-09-2017	21-09-2017	2	Excelente. .La actividad es de utilidad para la formación general del doctorando.

DETALLE DE LA ACTIVIDAD N.º 24

<u>INSTITUCIÓN DONDE SE REALIZÓ</u>	<u>TIPO INSTITUCIÓN</u>	<u>CENTRO</u>	<u>PAÍS</u>
Aula G1, Facultad de Ciencias	Universidad	Escuela Internacional de Posgrado	ESPAÑA
<u>TÍTULO</u>			
Asistencia a cursos, seminarios o conferencias			
<u>DESCRIPCIÓN</u>			
Scientific research, publishing and ethics			
<u>FECHA INICIO</u>	<u>FECHA FIN</u>	<u>Nº DE HORAS</u>	<u>VALORACIÓN DEL TUTOR</u>
25-09-2017	28-09-2017	9	Excelente. .Actividad de gran utilidad para la formación ética del doctorando en relación con las publicaciones científicas

DETALLE DE LA ACTIVIDAD N.º 25

<u>INSTITUCIÓN DONDE SE REALIZÓ</u>	<u>TIPO INSTITUCIÓN</u>	<u>CENTRO</u>	<u>PAÍS</u>
Salón de Grados (Facultad de Ciencias)	Universidad	ECsens, Facultad de Ciencias, Programa de Doctorado en Química, Departamento de Química Analítica	ESPAÑA
<u>TÍTULO</u>			
Asistencia a cursos, seminarios o conferencias			
<u>DESCRIPCIÓN</u>			
Biomimetic Microfluidics and Stimuli Responsive Materials: New Solutions to Old Problems in Bio-Chemical Sensing			
<u>FECHA INICIO</u>	<u>FECHA FIN</u>	<u>Nº DE HORAS</u>	<u>VALORACIÓN DEL TUTOR</u>
18-10-2017	18-10-2017	2	Excelente. .Actividad organizada dentro del grupo de investigación y en relación con su trabajo de Tesis Doctoral

DETALLE DE LA ACTIVIDAD N.º 26

<u>INSTITUCIÓN DONDE SE REALIZÓ</u>	<u>TIPO INSTITUCIÓN</u>	<u>CENTRO</u>	<u>PAÍS</u>
Facultad de Ciencias	Universidad	Salón de Actos (Edificio Mecenas) y Sala de Exposiciones (Hall de la Facultad de Ciencias)	ESPAÑA
<u>TÍTULO</u>			
Asistencia a cursos, seminarios o conferencias			
<u>DESCRIPCIÓN</u>			
I Simposio de la Unidad de Excelencia de Química Aplicada a Biomedicina y Medioambiente			
<u>FECHA INICIO</u>	<u>FECHA FIN</u>	<u>Nº DE HORAS</u>	<u>VALORACIÓN DEL TUTOR</u>
12-01-2018	12-01-2018	6	Excelente. .Actividad de la Unidad de Excelencia de Química de interés para la formación integral del doctorando

DETALLE DE LA ACTIVIDAD N.º 27

<u>INSTITUCIÓN DONDE SE REALIZÓ</u>	<u>TIPO INSTITUCIÓN</u>	<u>CENTRO</u>	<u>PAÍS</u>
Salón de Grados (Facultad de Ciencias)	Universidad	Unidad de Excelencia de Química aplicada a Biomedicina y Medioambiente	ESPAÑA
<u>TÍTULO</u>			
Asistencia a cursos, seminarios o conferencias			
<u>DESCRIPCIÓN</u>			
From interlocking and knotted rings to molecular machines			
<u>FECHA INICIO</u>	<u>FECHA FIN</u>	<u>Nº DE HORAS</u>	<u>VALORACIÓN DEL TUTOR</u>
08-06-2018	08-06-2018	2	Excelente. .Actividad organizada por la Unidad de Excelencia de Química de gran interés por la categoría del conferenciante.

DETALLE DE LA ACTIVIDAD N.º 28

<u>INSTITUCIÓN DONDE SE REALIZÓ</u>	<u>TIPO INSTITUCIÓN</u>	<u>CENTRO</u>	<u>PAÍS</u>
Espacio V Centenario (Antigua Facultad de Medicina Universidad de Granada)	Universidad	Escuela Internacional de Posgrado, Universidad de Granada, CRD - Consejo de Representantes de Doctorandos	ESPAÑA
<u>TÍTULO</u>			
Presentación de una comunicación (póster u oral) en un congreso nacional o internacional			
<u>DESCRIPCIÓN</u>			
Ha presentado una comunicación en formato oral relativa al trabajo de investigación que está realizando de acuerdo con el plan previsto.			
<u>FECHA INICIO</u>	<u>FECHA FIN</u>	<u>Nº DE HORAS</u>	<u>VALORACIÓN DEL TUTOR</u>
20-06-2018	22-06-2018	23	Excelente. .Actividad de interés general para el fomento de la interdisciplinariedad.

DETALLE DE LA ACTIVIDAD N.º 29

<u>INSTITUCIÓN DONDE SE REALIZÓ</u>	<u>TIPO INSTITUCIÓN</u>	<u>CENTRO</u>	<u>PAÍS</u>
Salón de Actos del Centro de Instrumentación Científica, UGR.	Universidad	Dpto. Química Orgánica, Unidad de Excelencia de Química aplicada a Biomedicina y Medioambiente de la Universidad de Granada.	ESPAÑA
<u>TÍTULO</u> Asistencia a cursos, seminarios o conferencias			
<u>DESCRIPCIÓN</u> Making Electronic and Optoelectronic Materials from Molecular Building Blocks			
<u>FECHA INICIO</u>	<u>FECHA FIN</u>	<u>Nº DE HORAS</u>	<u>VALORACIÓN DEL TUTOR</u>
25-09-2018	25-09-2018	1	Excelente. .Actividad de interes en el contexto del grupo de investigacion acerca de sensores.

DETALLE DE LA ACTMIDAD N.º 30

<u>INSTITUCIÓN DONDE SE REALIZÓ</u>	<u>TIPO INSTITUCIÓN</u>	<u>CENTRO</u>	<u>PAÍS</u>
Aula G1 - Facultad de Ciencias	Universidad	Academia de Ciencias Matemáticas, Físico-Químicas y Naturales de Granada	ESPAÑA
<u>TÍTULO</u> Asistencia a cursos, seminarios o conferencias			
<u>DESCRIPCIÓN</u> Nanotecnología en la vida cotidiana			
<u>FECHA INICIO</u>	<u>FECHA FIN</u>	<u>Nº DE HORAS</u>	<u>VALORACIÓN DEL TUTOR</u>
26-09-2018	26-09-2018	2	Excelente. .Actividad de formacion general sobre el tema de investigacion del doctorando.

DETALLE DE LA ACTMIDAD N.º 31

<u>INSTITUCIÓN DONDE SE REALIZÓ</u>	<u>TIPO INSTITUCIÓN</u>	<u>CENTRO</u>	<u>PAÍS</u>
Palacio de Congresos de Granada	Universidad	Grupo Regional Andaluz de la Sociedad Española de Química Analítica	ESPAÑA
<u>TÍTULO</u> Presentación de una comunicación (póster u oral) en un congreso nacional o internacional			
<u>DESCRIPCIÓN</u> Contribucion en congreso (GRASEQA 2018) para difundir sus resultados de investigacion			
<u>FECHA INICIO</u>	<u>FECHA FIN</u>	<u>Nº DE HORAS</u>	<u>VALORACIÓN DEL TUTOR</u>
01-10-2018	05-10-2018	35	Excelente. .Congreso regional de la Sociedad de Química Analítica donde ha presentado una comunicacion.

DETALLE DE LA ACTMIDAD N.º 32

<u>INSTITUCIÓN DONDE SE REALIZÓ</u>	<u>TIPO INSTITUCIÓN</u>	<u>CENTRO</u>	<u>PAÍS</u>
Salón de Actos (Edificio Mecenas, Facultad de Ciencias)	Universidad	Departamento de Química Analítica <<Fermin Capitán García>>, ECsens, Facultad de Ciencias, Unidad de Excelencia de Química Aplicada a la Biomedicina y al Medioambiente, Escuela Internacional de Posgrado	ESPAÑA
<u>TÍTULO</u> Asistencia a cursos, seminarios o conferencias			
<u>DESCRIPCIÓN</u> Design and synthesis of indicator dyes for smart textiles: applications in medicine, wellness and sports			
<u>FECHA INICIO</u>	<u>FECHA FIN</u>	<u>Nº DE HORAS</u>	<u>VALORACIÓN DEL TUTOR</u>
19-11-2018	19-11-2018	1	Excelente. .Actividad organizada por el grupo de investigacion de interes en el campo de sensores.

DETALLE DE LA ACTMIDAD N.º 33

<u>INSTITUCIÓN DONDE SE REALIZÓ</u>	<u>TIPO INSTITUCIÓN</u>	<u>CENTRO</u>	<u>PAÍS</u>
Salón de Grados de la Facultad de Ciencias	Universidad	Máster en Física	ESPAÑA
<u>TÍTULO</u> Asistencia a cursos, seminarios o conferencias			
<u>DESCRIPCIÓN</u> Sensado y Computación Neuromórfica con Dispositivos Emergentes			
<u>FECHA INICIO</u>	<u>FECHA FIN</u>	<u>Nº DE HORAS</u>	<u>VALORACIÓN DEL TUTOR</u>
21-02-2019	21-02-2019	3	Excelente. .Actividad de interes en el campo de inteligencia artificial que tambien es de utilidad en el campo de sensores difusos.

EL COORDINADOR

*EL DIRECTOR DE LA ESCUELA DE DOCTORADO DE CIENCIAS,
TECNOLOGÍAS EN INGENIERÍAS*

Carrasco Marín, Francisco

García Casco, Antonio

