Universidad de Oviedo

MÁSTER EN CIENCIAS ANALíTICAS Y BIOANALíTICAS

Trabajo Fin de Máster

"Síntesis, caracterización y empleo de nanopartículas de carbono dopadas con nitrógeno como fases sensoras para metales"

Nuria Basdediós Prieto

Julio 2015, Oviedo

OBJETIVO

El objetivo del presente Trabajo de Fin de Máster es llevar a cabo la síntesis de diversos Carbon Dots empleando una síntesis hidrotérmica en horno de microondas, utilizando para su síntesis compuestos orgánicos ricos en nitrógeno que, además de actuar como fuente de carbono, le confieran a los materiales una funcionalidad adecuada para interaccionar con metales.

Las nanopartículas sintetizadas por esta vía se caracterizarán empleando técnicas de microscopía y espectroscópicas. Asimismo, se estudiará el potencial que estos compuestos ofrecen para su empleo como fases sensoras en la detección de metales en muestras medioambientales.

Tabla de contenido

INTRODUCCIÓN 3

1. Nanopartículas de carbono 3

1.1. Carbon Dots 4

1.2. Onion Dots 6

2. Fundamentos luminiscencia molecular 7

DESARROLLO EXPERIMENTAL 9

1. Reactivos, disoluciones y protocolos 9

1.1. Reactivos 9

1.2. Disoluciones 9

1.3. Protocolo de síntesis de nanopartículas de carbono y *Onion dots* 10

2. Instrumentación 14

3. Material 14

4. Protocolos de medidas de luminiscencia 15

RESULTADOS Y DISCUSIÓN 17

1. Optimización de las condiciones de fosforescencia 17

1.1. Calibrado y reproducibilidad 18

2. Nanopartículas de albúmina 19

2.1. Caracterización espectroscópica 19

2.2. Caracterización microscópica 24

2.3. Interacción de las nanopartículas de albúmina con diferentes metales 25

3. Nanopartículas de glutatión 33

3.1. Caracterización espectroscópica 33

3.2. Caracterización microscópica 34

3.3. Interacción de las nanopartículas de glutatión sintetizadas en microondas con diferentes metales 36

3.4. Variación de la intensidad relativa de fluorescencia según la concentración de nanopartículas añadida 40

3.5. Nanopartículas de glutatión sintetizadas en estufa 40

4. Nanopartículas de productos naturales 44

5. Muestras reales 45

CONCLUSIONES 46

BIBLIOGRAFÍA 47

INTRODUCCIÓN

En los últimos años los nanomateriales luminiscentes han sido estudiados intensamente debido al elevado potencial que poseen en su empleo como sensores, agentes de bio-imagen, administración de fármacos y otras aplicaciones biomédicas. Entre ellos los puntos de carbono, también llamados Carbon Dots (C-Dots), han atraído la atención debido a su baja toxicidad, bajo coste, alta estabilidad química, biocompatibilidad, facilidad de síntesis y funcionalización.

1. Nanopartículas de carbono

La familia de materiales de carbono en escala nanométrica contempla una amplia diversidad de formas, tratándose además de un área en rápido desarrollo tanto a nivel de investigación como a nivel de aplicación. [(1)]

En la actualidad se conocen diversos tipos de nanoestructuras basadas en carbono, tales como el grafeno, los puntos de carbono (*carbon dots*), nanotubos de carbono, *onion dots*, etc. [(2)]

El **grafeno** está formado por átomos de carbono dispuestos en una lámina bidimensional (2D) siguiendo en una estructura hexagonal regular.

Los **nanotubos de carbono,** por su parte, se caracterizan por ser moléculas tubulares de diámetro nanométrico. En función de su grado de enrollamiento se distinguen dos tipos de nanotubos: los nanotubos de pared simple (SWCNT), formados por una única capa cilíndrica de grafeno, y los nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNT), que contienen una serie de capas cilíndricas de grafeno concéntricamente anidadas con un diámetro de entre 10 y 20 nm y un espaciamiento entre capas de 3’4 Å. [(2)]

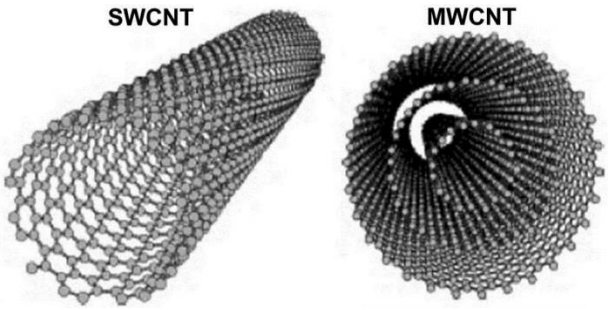

Figura 1. Nanotubos de carbono de pared simple (SWCNT) y nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNT)

Los ***Carbon Dots*** **(C-Dots),** también llamados puntos de carbono, son nanopartículas luminiscentes cuasiesféricas de carbono. Presentan ventajas tales como una excelente solubilidad en agua, estabilidad química y fotoestabilidad, luminiscencia multicolor, baja toxicidad y una buena permeabilidad celular, por lo que ofrecen multitud de aplicaciones en el campo de la biología celular, bioimagen, administración de fármacos, biosensores,etc. [3]

Por su parte los ***Onion Dots*** **(ODs)** consisten en una agrupación de conchas de carbono esféricas (fullerenos) cerrados de forma concéntrica alrededor de un núcleo hueco, con diámetros que oscilan entre los 3 y los 50 nm. [4,5]

El presente Trabajo de Fin de Máster se centrará en llevar a cabo la síntesis de C-Dots a partir de diferentes sustancias de partida y de ODs a partir de productos naturales.

1.1. Carbon Dots

El descubrimiento accidental de C-Dots durante la separación y purificación de nanotubos de carbono de pared simple (SWCNTs) por Xu et al. en 2004 [6] desencadenó una gran cantidad de estudios posteriores con el fin de explorar sus propiedades luminiscentes.

Debido a que los diferentes parámetros de reacción que intervienen en la síntesis de estas nanopartículas pueden alterar las propiedades de los C-Dots obtenidos, a lo largo de estos años se han probado diversos materiales de partida así como diferentes

métodos de síntesis. Las vías de síntesis de estos compuestos pueden agruparse en dos grandes grupos, según cuál sea la fuente de carbono: una primera vía que utiliza moléculas simples para su síntesis y una segunda que emplea materiales naturales. La primera vía incluye procesos de síntesis como la exfoliación electroquímica [7,8], el arco de descarga [6,9], o la ablación láser/pasivación [10-12]; entre los procedimientos habituales de la segunda vía pueden destacarse la combustión térmica o hidrotérmica, la oxidación ácida [13-18], o la oxidación mediante microondas/ultrasonidos. [19-24]

En la *Tabla 1* se muestran ejemplos de distintos precursores empleados junto a sus respectivos métodos de síntesis.

Tabla 1. Distintos métodos de síntesis y precursores empleados en la síntesis de C-Dots

Precursores	Método de síntesis	Referencias
Glucosa + Triptófano	Microondas (700W)	*[19]*
Líquidos iónicos	Microondas (650W)	*[28]*
Ácido fólico + etilenglicol	Ultrasonidos / Calentamiento	*[29]*
Ácido L-glutámico	Calentamiento	*[30]*
Benzeno	Arco plasma	*[31]*
Ácido cítrico + polietilenimina	Pirólisis	*[32]*
Carbohidratos (glucosa, sacarosa,…)	Tratamiento con ácidos y pasivación amínica de la superficie	*[33]*
Ácido Cítrico + amoníaco	Tratamiento hidrotérmico	*[14]*
Ácido cítrico + hidrazina	Tratamiento hidrotérmico	*[16]*
Óxido de grafeno + H_2O_2 + NH_3	Tratamiento hidrotérmico	*[13]*
Ácido Cítrico + L-Cisteína	Tratamiento hidrotérmico	*[34]*

1.1.1. Composición

Los C-Dots están constituidos fundamentalmente por tres elementos: carbono, hidrógeno y oxígeno.

A lo largo de estos años se ha estudiado la introducción de diferentes heteroátomos en la estructura de estos nanocompuestos con el objetivo de conferirles funcionalidades adicionales. Por ejemplo, se sabe que el rendimiento cuántico de los C-Dots puede mejorarse significativamente mediante la incorporación de Nitrógeno a su estructura, modificando de esta forma su reactividad química. Se han empleado multitud de compuestos nitrogenados para sintetizar C-Dots, siendo generalmente los aminoácidos, los péptidos y las proteínas los reactivos más utilizados. *(3, 19,25-27)*

Como se indicó anteriormente, los C-Dots se sintetizan a partir de materiales naturales (por ejemplo, varilla de grafito, hollín, negro de humo, etc.) o reactivos carbonosos (etilenglicol, ácido cítrico, glucosa,…). Posteriormente se introdujeron otros métodos de síntesis: microondas, combustión, métodos hidrotérmicos, etc., en los cuales pueden incorporarse reactivos de pasivación o dopaje durante el proceso de síntesis, evitando de esta manera modificaciones adicionales y acelerando y simplificando el proceso de síntesis. Cabe destacar que a menudo es difícil distinguir entre elemento de dopaje y elemento de pasivación, ya que los reactivos nitrogenados pueden servir tanto como pasivante de superficie como fuente de nitrógeno.

1.2. Onion Dots

Tal y como se ha mencionado previamente, los ODs consisten en una agrupación de fullerenos cerrados de forma concéntrica alrededor de un núcleo hueco. Sus diámetros oscilan entre los 3 y los 50 nm dependiendo del método de síntesis: deposición química de vapor utilizando catalizadores (15-50 nm) [35], descarga de arco en presencia de nanopartículas de metal (3-30 nm) [36], descarga de arco bajo el agua (4-36 nm) [37], irradiación de electrones [38, 39], entre otras. Debido a su elevada área superficial (30-500 m2/g), alta conductividad eléctrica (1-10 S/cm) y alta estabilidad térmica este tipo de nanopartículas tienen también una amplia aplicabilidad, desde el almacenamiento de gas hasta células fotovoltaicas o catálisis, aplicaciones biomédicas, etc. [40]

2. Fundamentos luminiscencia molecular

La fotoluminiscencia es el proceso por el cual los átomos o moléculas emiten luz tras haberse excitado previamente mediante la absorción de radiación electromagnética, como normal general, de mayor energía que la emitida. La emisión de luz se produce cuando las especies excitadas vuelven al estado fundamental.

En la *Figura* 2 se muestra el diagrama de Jablonski. Las líneas horizontales representan los distintos niveles vibracionales de los diferentes niveles electrónicos: el singlete fundamental, S0, los singletes excitados S1 y S2 o el triplete excitado T1.

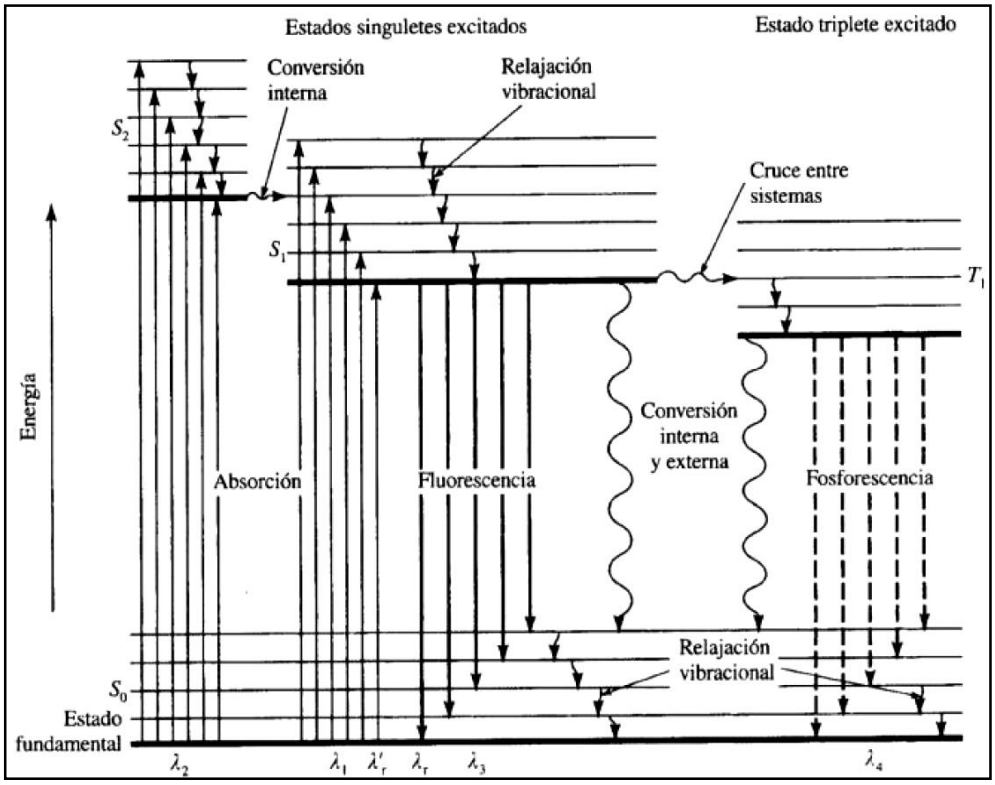

Figura 2. diagrama de niveles de energía de una molécula fotoluminiscente característica

La fluorescencia se diferencia de la fosforescencia en que las transiciones electrónicas que producen la fluorescencia no llevan asociadas un cambio de espín del electrón, mientras que la fosforescencia sí. Dado que el cambio en la multiplicidad como consecuencia de la absorción de radiación electromagnética está prohibida por las

reglas de la mecánica-cuántica, la fosforescencia presenta un tiempo de vida más largo que la fluorescencia, siendo del orden de milisegundos a segundos frente a los nanosegundos habituales en la segunda. En prácticamente todos los casos la emisión fotoluminiscente (tanto fluorescencia como fosforescencia) es de mayor longitud de onda que la radiación empleada para su excitación.

Una molécula excitada puede también volver a su estado fundamental mediante procesos no radiantes, los cuales se conocen con el nombre de **procesos de desactivación**.

En disolución, el exceso de energía vibracional se pierde como consecuencia de las colisiones entre moléculas de las especies excitadas y el disolvente (**conversión externa**). Cuando dos niveles vibracionales de dos estados electrónicos diferentes están suficientemente próximos la molécula puede pasar de un estado electrónico a otro de más baja energía sin emisión de radiación (**conversión interna**). Si durante este proceso se invierte el espín de un electrón excitado, produciendo un cambio en la multiplicidad de la molécula, el proceso se denomina **cruce entre sistemas**.

El camino más favorable hacia el estado fundamental es aquel que minimiza el tiempo de vida del estado excitado. Así, si la desactivación por fluorescencia es más rápida que los procesos no radiantes, se observará esta emisión. Si por su parte, la desactivación no radiante tuviese una constante de velocidad más favorable, la fluorescencia desaparecería o sería menos intensa.

La fotoluminiscencia está limitada a un número relativamente pequeño de sistemas, los cuales incorporan unas determinadas características estructurales y ambientales que hacen que la velocidad de estos procesos de desactivación se minimicen hasta el punto de que la emisión fluorescente o fosforescente pueda competir cinéticamente con ellos.

En la actualidad, los métodos luminiscentes son ampliamente utilizados debido a sus amplios intervalos de linealidad y a sus elevados límites de detección, del orden de los ppb, entre uno y tres órdenes de magnitud inferiores a los que caracterizan a la espectroscopía de absorción.

DESARROLLO EXPERIMENTAL

1. Reactivos, disoluciones y protocolos

1.1. Reactivos

La albúmina de suero bovino (BSA), el yoduro potásico, el ácido cítrico (AC), el cloruro de europio hexahidratado, el nitrato de plata, el bromuro sódico, la tiroxina (Tx) y el L-glutatión (GSH) reducido fueron comprados a Sigma-Aldrich-Fluka. El nitrato de mercurio (II), el sulfato ferroso heptahidratado, el bicarbonato sódico y el nitrato sódico fueron adquiridos a Merck y el nitrato de calcio tetrahidratado a Panreac. El sulfito sódico, el sulfato de manganeso, el nitrato de cadmio tetrahidratado, el nitrato de cobalto (II), el nitrato sódico, el nitrito sódico son Probus. El hidróxido sódico, el nitrato férrico, el cloruro sódico, el nitrato de cobre (II) son Prolabo. Las disoluciones madre y sus correspondientes diluciones se realizan con agua destilada.

1.2. Disoluciones

Diariamente se preparan disoluciones de BSA 10^{-4}M, KI 5M y Na_2SO_3 2M por pesada directa, dilución y enrase en un matraz aforado.

Las disoluciones metálicas de $Fe(NO_3)_3$, $Cu(NO_3)_2$, $Co(NO_3)_2$, $Cd(NO_3)_2{\cdot}4H_2O$., $Hg(NO_3)_2$, $Ca(NO_3)_2{\cdot}4H_2O$, $NaNO_3$, $AgNO_3$, $FeSO_4{\cdot}6H_2O$ y $MnSO_4$ se prepararon en concentración 1M por pesada directa de la cantidad necesaria de la sal y su disolución en agua destilada. La disolución de $EuCl_3{\cdot}6H_2O$ se preparó en concentración 0,1M por el mismo procedimiento.

Para el estudio de reactividad con distintos aniones, se prepararon disoluciones de sulfito sódico, cloruro sódico, nitrito sódico, bromuro sódico, hidróxido sódico, bicarbonato sódico y nitrato sódico en concentración 1M por pesada directa de las sales y posterior disolución y enrase en agua destilada.

1.3. Protocolo de síntesis de nanopartículas de carbono y *Onion dots*

1.3.1. Nanopartículas de albúmina

Se sintetizaron cuatro tipos de nanopartículas de BSA según estuvieran modificadas con tiroxina, yoduro potásico, sulfato de manganeso o cloruro de europio.

Tras la pesada de los reactivos correspondientes, los cuales se muestran en la *Tabla 2* para cada tipo de nanopartícula, se añadieron 25 mL de agua MiliQ, realizándose seguidamente una disolución manual de todas ellas. Posteriormente se sonicaron durante 10 minutos y se introdujeron en recipientes herméticos en el microondas a 750 W durante 5 minutos, aplicándosele una rampa desde temperatura ambiente hasta 180ºC en el primer minuto y manteniéndose constante a esta temperatura durante los 4 minutos posteriores. En todos los casos se obtienen disoluciones traslúcidas con una ligera tonalidad amarilla, excepto en el caso de la disolución 3a (5% Tx), la cual presentó una ligera turbidez. Las disoluciones obtenidas fueron dializadas durante 48 horas frente a agua destilada.

Tabla 2. Nanopartículas de BSA sintetizadas

a) Tiroxina

	Tiroxina (g)	**BSA (g)**	**Ácido Cítrico (g)**	**H_2O-MiliQ (mL)**
0%	-	0’500	1	25
1% Tx	0’005	0’495	1	25
5% Tx	0’025	0’475	1	25

b) KI

	KI (g)	BSA (g)	Ácido Cítrico (g)	H_2O-MiliQ (mL)
0%	-	0’500	1	25
“1% KI”	$4'27x10^{-3}$	0’495	1	25
“5% KI”	0’021	0’475	1	25
25% KI	0’125	0’375	1	25

c) Manganeso

	Mn (g)	BSA (g)	Ácido Cítrico (g)	H_2O-MiliQ (mL)
0%	-	0’500	1	20
1% Mn	0’005	0’495	1	20
5% Mn	0’025	0’475	1	20
10% Mn	0’050	0’450	1	20
15% Mn	0’075	0’425	1	20
20% Mn	0’100	0’400	1	20

En este caso, con el objetivo de concentrar las nanopartículas sintetizadas se redujo el volumen de H_2O añadido a 20 mL.

d) Europio

	Eu (g)	BSA (g)	Ácido Cítrico (g)	H_2O-MiliQ (mL)
0%	-	0’500	1	20
1% Eu	0’005	0’495	1	20
5% Eu	0’025	0’475	1	20
20% Eu	0’100	0’375	1	20

1.3.2. Nanopartículas de glutatión

a) Síntesis 1

Al igual que en el caso de las nanopartículas sintetizadas a partir de albúmina se pesaron previamente todos los reactivos sólidos, añadiéndose en este caso solamente 10 mL de agua MiliQ, con el objetivo de conseguir una cantidad todavía más concentrada de nanopartículas. Las disoluciones obtenidas se sonicaron durante 10 minutos y se introdujeron en el microondas a 750 W durante 35 minutos, aplicándosele una rampa desde temperatura ambiente hasta 180 ºC en los primeros 20 minutos y manteniéndose constante a esta temperatura durante los 15 minutos posteriores. Las disoluciones obtenidas se dializaron durante 48 horas. En todos los casos se obtuvieron disoluciones translúcidas con una fuerte tonalidad amarilla.

Tabla 3. Nanopartículas de BSA sintetizadas

	Mn (g)	**Glutatión (g)**	**Ácido Cítrico (g)**	**H_2O-MiliQ (mL)**
0%	-	0’500	1	10
1% Mn	0’005	0’495	1	10
5% Mn	0’025	0’475	1	10
12% Mn	0’060	0’440	1	10
20% Mn	0’100	0’400	1	10

b) Síntesis 2

Para comparar distintos métodos de síntesis, se realizó una segunda síntesis de nanopartículas de glutatión con 1% de Mn, empleando esta vez un método de síntesis más agresivo.

Así, tras la pesada de reactivos, la adición de 10 mL de agua y el posterior baño de ultrasonidos durante 10 minutos la disolución obtenida se introdujo en estufa a 180ºC durante 2 horas y media, añadiendo cada media hora entre 1 y 2 mL de H_2O para evitar

que la disolución llegase a sequedad. Transcurrido este tiempo se añadieron 10 mL de agua miliQ, obteniéndose una disolución anaranjada.

1.3.3. Nanopartículas de productos naturales

Finalmente, se llevó a cabo la síntesis de Onion Dots por medio de un método de carbonización térmica, empleando como fuentes de carbono zumos de dos tipos diferentes de tomate (tomate bola y tomate kumato) y zanahoria, productos naturales que poseen un alto contenido de licopeno, un hidrocarburo poliinsaturado.

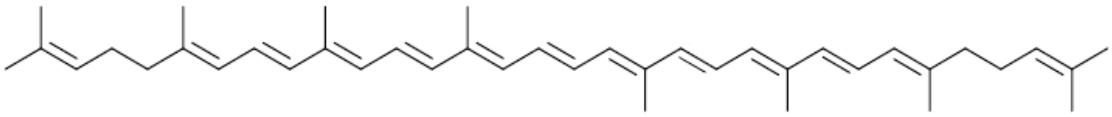

Figura 3. Estructura molecular del licopeno

Se pesaron 10 gramos de zumo de cada uno de ellos en sus respectivos crisoles y se dejaron durante 24 horas en la estufa a 80ºC, con el objetivo de eliminar parte de la humedad que éstos zumos contenían. Posteriormente se introdujeron en estufa a 240ºC. Transcurridas dos horas se enfriaron las tres disoluciones hasta temperatura ambiente y se añadieron 5 mL de NaOH 30%, dejándose en estufa nuevamente a 240ºC durante dos horas más. El color obtenidos tras el proceso de carbonización fue diferente en cada caso: el producto proveniente del tomate kumato mostró un color marrón anaranjado, mientras que tanto el proveniente del tomate bola como el de la zanahoria mostraron un color mayoritariamente amarillo.

En todos los casos la parte soluble del producto obtenido fue extraída empleando 50 mL de agua destilada y posteriormente filtrada a través de un filtro de nylon de 0’45 µm. Finalmente, para purificar el producto la disolución de filtrado se dializó durante 3 días frente a agua destilada.

2. Instrumentación

La síntesis de C-Dots se llevó a cabo empleando un microondas Ethos One (Milestone), excepto en uno de los casos (1% Mn) en el cual se utilizó una estufa Binder, al igual que en la síntesis de *Onion Dots* (ODs).

Las medidas de fotoluminiscencia se realizaron en un espectrofotómetro de luminiscencia Varian Cary Eclipse (Varian Ibérica) equipado con una lámpara de Xenón, monocromadores Czerny-Turner y un tubo fotomultiplicador modelo R-298 como detector.

La caracterización microscópica de las nanopartículas sintetizadas se realizó con los siguientes equipos:

- Microscopio electrónico de transmisión (TEM) modelo MET JEOL-200 EX II
- Microscopio electrónico de transmisión de alta resolución (HRTEM) modelo MET JEOL-JEM-2100F

Para la pesada de los reactivos se utilizó una balanza analítica Mettler AE316 y una balanza granataria Mettler Toledo PG802-S.

Además fue necesario emplear un baño de ultrasonidos J.P. Selecta, diversas bolsas de diálisis (Sigma Aldrich) y un equipo de agua Mili-Q Advantage, Milipore.

3. Material

Todas las medidas de luminiscencia se realizaron en una celda de cuarzo convencional Hellma, con paso óptico de 10 mm. Para la preparación de las disoluciones se emplearon micropipetas Labmate P1000 y P100 y material volumétrico de vidrio. Se utilizaron también tubos cónicos *Eppendorf* de 2,0 mL, crisoles y filtros de jeringa de membrana de bifluoruro de polivinildieno (PVDF), con un tamaño de poro de 0,45 micras y un diámetro de 25 mm.

4. Protocolos de medidas de luminiscencia

Las condiciones de medida en el caso de las nanopartículas de albúmina fueron λ_{exc} = 280 nm (máximo de absorbancia de las proteínas) y λ_{exc} = 345 nm (máximo de absorbancia de las nanopartículas de albúmina sintetizadas). Las rendijas de emisión y excitación se fijaron en 10 nm, excepto en el caso de las medidas a λ_{exc} = 280 nm, donde se fijaron en 5 nm.

Las pruebas de sensibilidad de las nanopartículas a los distintos metales y aniones se realizaron empleando una concentración de metal/anión en cubeta de 40 mM, añadiendo la cantidad correspondiente de nanopartículas de BSA hasta un volumen final de 2'5 mL, siguiendo las condiciones de medida previamente mencionadas.

Para la realización de las rectas de calibrado de los metales que actúan como desactivante de fluorescencia de las nanopartículas se llevaron a cabo medidas a distintas concentraciones de metal, añadiendo 50 µL de nanopartículas y abriendo las rendijas de emisión y excitación a 10 y 20 nm, respectivamente, en las medidas a λ_{exc} = 345 nm, y a 5 y 10 nm en el caso de las medidas a λ_{exc} = 280 nm.

Por su parte, las nanopartículas de glutatión se midieron a λ_{exc} = 320 nm (máximo de absorbancia de las nanopartículas de glutatión sintetizadas), con rendijas de emisión y excitación de 2'5 y 5 nm, respectivamente. Las pruebas de sensibilidad de estas nanopartículas a los distintos metales y aniones se realizaron empleando una concentración de metal/anión en cubeta de 4 mM y añadiendo 50 µL de nanopartículas en un volumen final de 2'5 mL, siguiendo las condiciones de medida previamente mencionadas. Para las rectas de calibrado de los metales que actúan como desactivante de fluorescencia de estas nanopartículas se emplearon distintas concentraciones de metal, a las que se añadieron 50 µL de estas nanopartículas, manteniendo las rendijas de emisión y excitación a 2'5 y 5 nm, respectivamente.

Todos los espectros de excitación de fluorescencia abarcaron el rango de 300 a 700 nm.

En las medidas de fosforescencia los anchos de las rendijas de emisión y excitación se fijaron en 20 nm, con un tiempo de decaimiento total de 0'02 s, un tiempo de demora

de 0’100 ms y un tiempo de integración de 5’000 ms, midiéndose los espectros en el rango de 300 a 700 nm. Para favorecer el cruce intersistemas y potenciar la fosforescencia, se añadió en cada caso una alícuota de KI hasta obtener una concentración 1’5 M en cubeta. Del mismo modo, se agregaron alícuotas de sulfito sódico hasta una concentración final de 0’2 M para desoxigenar el medio y evitar la desactivación de la fosforescencia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Optimización de las condiciones de fosforescencia

La emisión de fosforescencia a temperatura ambiente suele ser débil debido a que es una transición prohibida, pero altamente selectiva debido al escaso número de moléculas que muestran este tipo de luminiscencia. En el presente trabajo se ha empleado el sulfito sódico como desoxigenante químico para eliminar el oxígeno molecular disuelto, que actúa como "quencher" del estado triplete [41]. Además, se sabe que la señal fosforescente aumenta en presencia de átomos pesados, ya que éstos favorecen la población del estado excitado triplete. Por este motivo se añade yoduro de potasio a la muestra [42].

En primer lugar se estudió el efecto que ejercía la variación de la concentración de KI sobre la intensidad de fosforescencia de la BSA. Como puede observarse en la Figura 4 la intensidad de fosforescencia aumenta a medida que aumenta la concentración de KI hasta una concentración próxima a 1'5 M, donde se mantiene constante. Por este motivo se estableció la concentración de 1'5 M de KI como óptima para incrementar la señal fosforescente.

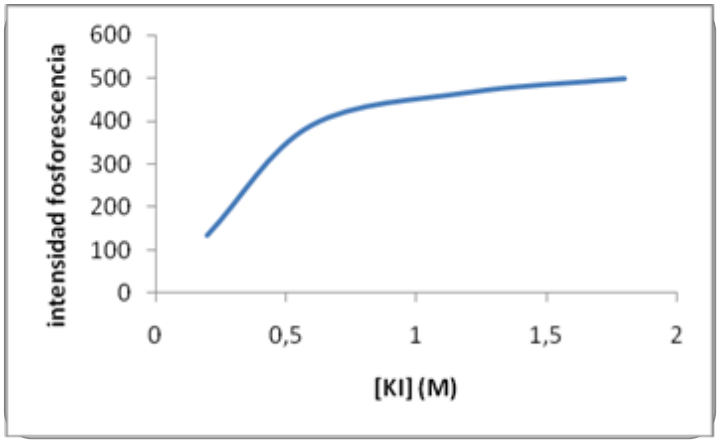

Figura 4. Variación de la intensidad fosforescente a medida que la concentración de KI aumenta.

Posteriormente se analizó el efecto de la variación de concentración de Na_2SO_3 sobre la intensidad, empleando para ello una concentración constante tanto de BSA (10^{-5} M) como de KI (1'5 M). Se observa que a partir de una concentración 0'2 M de Na_2SO_3 la intensidad de fosforescencia se vuelve constante *(Figura 5)* por lo que se escoge esta concentración como óptima para realizar las medidas de fosforescencia.

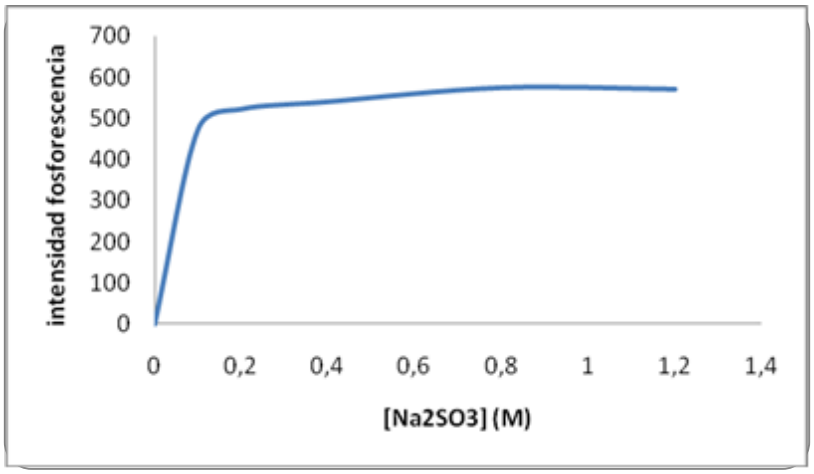

Figura 5. Variación de la intensidad fosforescente a medida que la concentración de Na_2SO_3 aumenta.

1.1. Calibrado y reproducibilidad

Con las condiciones previamente establecidas, se procedió a evaluar el intervalo dinámico lineal y el límite de detección para la albúmina bovina mediante la fosforescencia a temperatura ambiente, estableciendo dicho intervalo entre 10^{-6} y 10^{-5} M (*Figura 6*) y el límite de detección en 8'5x10^{-7} M.

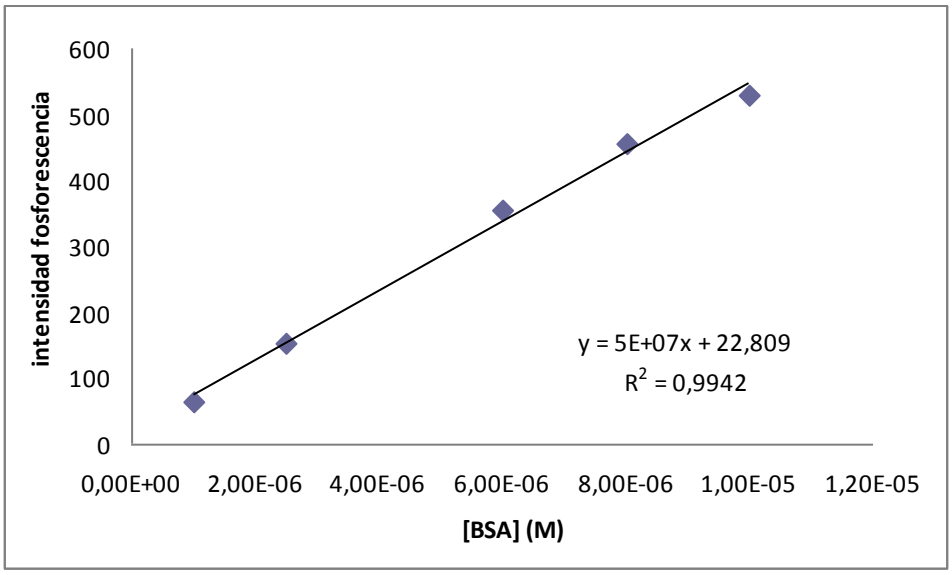

Figura 6. Recta de calibrado de la BSA

La reproducibilidad del método en las condiciones establecidas se evaluó midiendo 10 disoluciones de BSA $6x10^{-6}$ M, obteniéndose una desviación estándar relativa (%RSD) del 1'68%.

2. Nanopartículas de albúmina

2.1. Caracterización espectroscópica

La albúmina es la proteína más abundante en el plasma de los mamíferos. Está formada por 585 aminoácidos con 17 puentes disulfuro entrecruzados, y su peso molecular es de aproximadamente 67.000 Dalton. En este caso se ha empleado albúmina de suero bovino (BSA).

La albúmina presenta emisión fluorescente a λ_{exc}=280nm y λ_{em}=425nm. Esta fluorescencia es debida fundamentalmente a la presencia en su estructura de triptófano, tirosina y fenilalanina, todos ellos aminoácidos aromáticos. De forma general, se mide mayoritariamente la emisión de fluorescencia del triptófano debido a

que posee un mayor rendimiento cuántico, así como una vida media más prolongada. (43)

Tal y como puede observarse en la *Figura 7*, las nanopartículas sintetizadas a partir de albúmina y ácido cítrico presentan un máximo de emisión cuando la disolución es excitada a una λ_{exc}=345nm, y un máximo de excitación a λ_{em}=425nm.

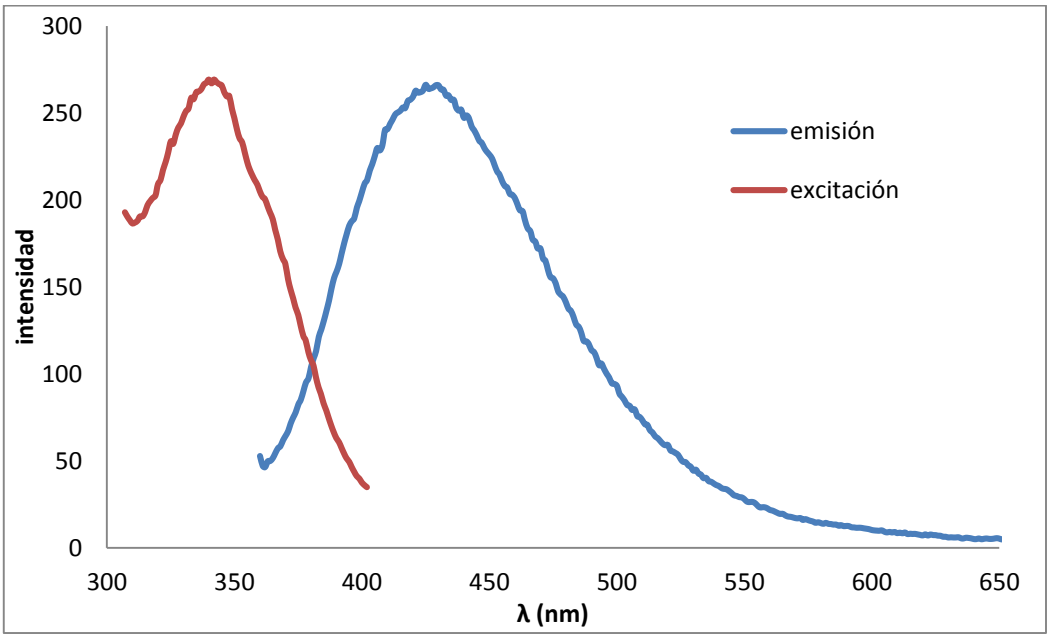

Figura 7. Espectro de emisión y excitación fluorescente de las nanopartículas de BSA + Ácido cítrico (λ_{exc}=345nm, λ_{em}=425nm)

La presencia de átomos pesados tanto en la molécula como en sus proximidades favorece el cruce entre sistemas, incrementando de esta manera la emisión fosforescente. Por este motivo, se doparon estas nanopartículas con una concentración equivalente de yodo (1 y 5%, respectivamente), procedente de dos fuentes diferentes: tiroxina (Tx) y KI.

Se midió la fosforescencia tanto de las nanopartículas en disolución, como de las nanopartículas en presencia de KI y Na_2SO_3, pero a pesar de ello no se consiguió que ninguna de estas nanopartículas presentasen fosforescencia.

Por su parte, las nanopartículas sintetizadas empleando tiroxina como fuente de yodo presentaron una intensidad de fluorescencia considerablemente menor que las sintetizadas a partir de KI, tal y como puede observarse en la *Figura 8*.

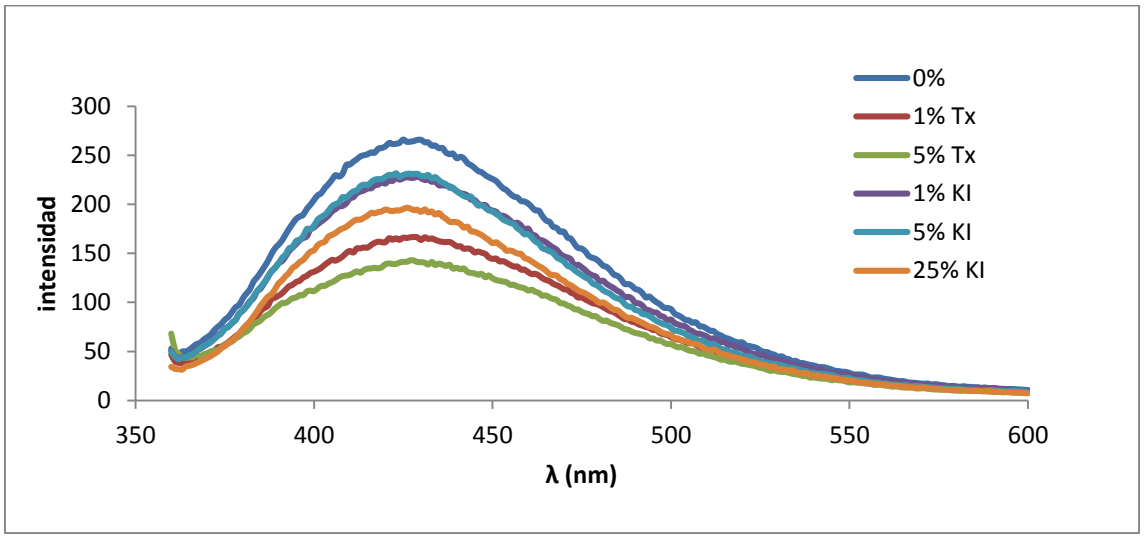

Figura 8. Espectro de emisión fluorescente de las nanopartículas de tiroxina y KI (λ_{exc}=345nm)

Las intensidades obtenidas excitando a una λ_{exc}=280nm (longitud de onda característica de proteínas en disolución) presentan una gran similitud en todos los casos.

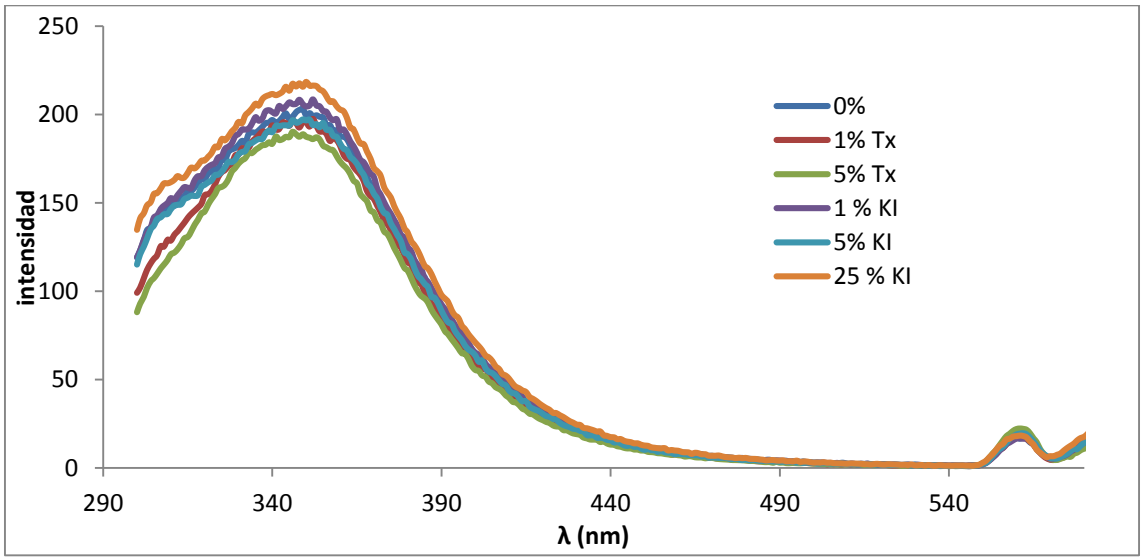

Figura 9. Espectro de emisión fluorescente de las nanopartículas de tiroxina y KI (λ_{exc}=280nm)

Se sabe que los compuestos que contienen Eu (III) pueden dar lugar a una fuerte luminiscencia característica, con largo tiempo de emisión, causada por la interacción y transferencia de energía inter e intra molecular al ion metálico. [44,45]

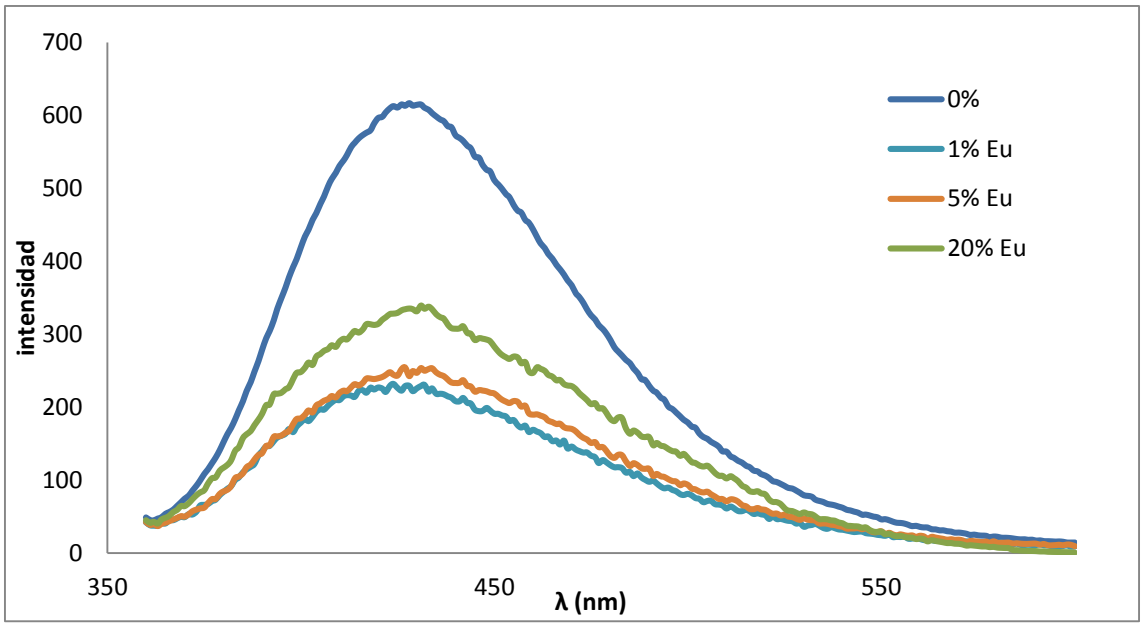

Figura 10. Espectro de emisión fluorescente de las nanopartículas de Eu (III) (λ_{exc}=345nm)

En otros casos, la incorporación de manganeso en la estructura de nanocompuestos permitió dar lugar a nanopartículas con una intensa emisión fosforescente, incluso en ausencia de desoxigenación de la muestra[46]. Por este motivo se sintetizaron nanopartículas en presencia de manganeso.

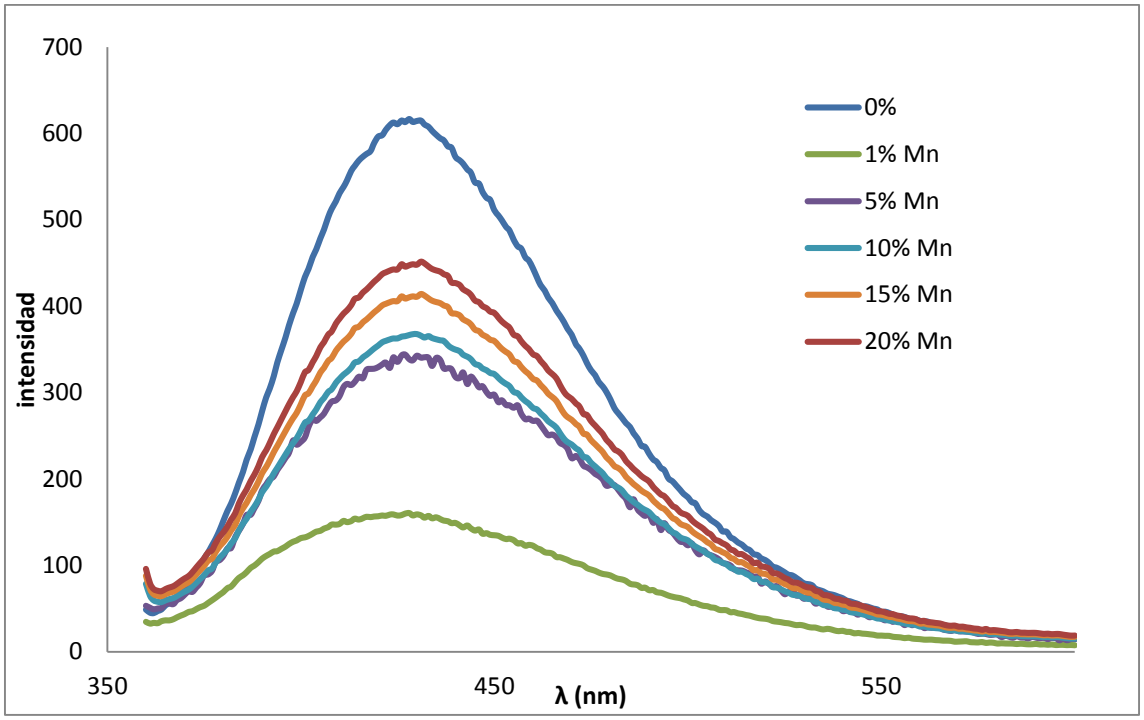

Figura 11. Espectro de emisión fluorescente de las nanopartículas de Mn (λ_{exc}=345nm)

Sin embargo, no se consiguió obtener nanopartículas con una intensidad de fosforescencia a temperatura ambiente significativa.

2.2. Caracterización microscópica

Se caracterizaron las nanopartículas sintetizadas a partir de BSA empleando la técnica de microscopía electrónica de transmisión, encontrándose pequeñas nanopartículas esféricas superpuestas, así como estructuras cilíndricas y alargadas de carbono.

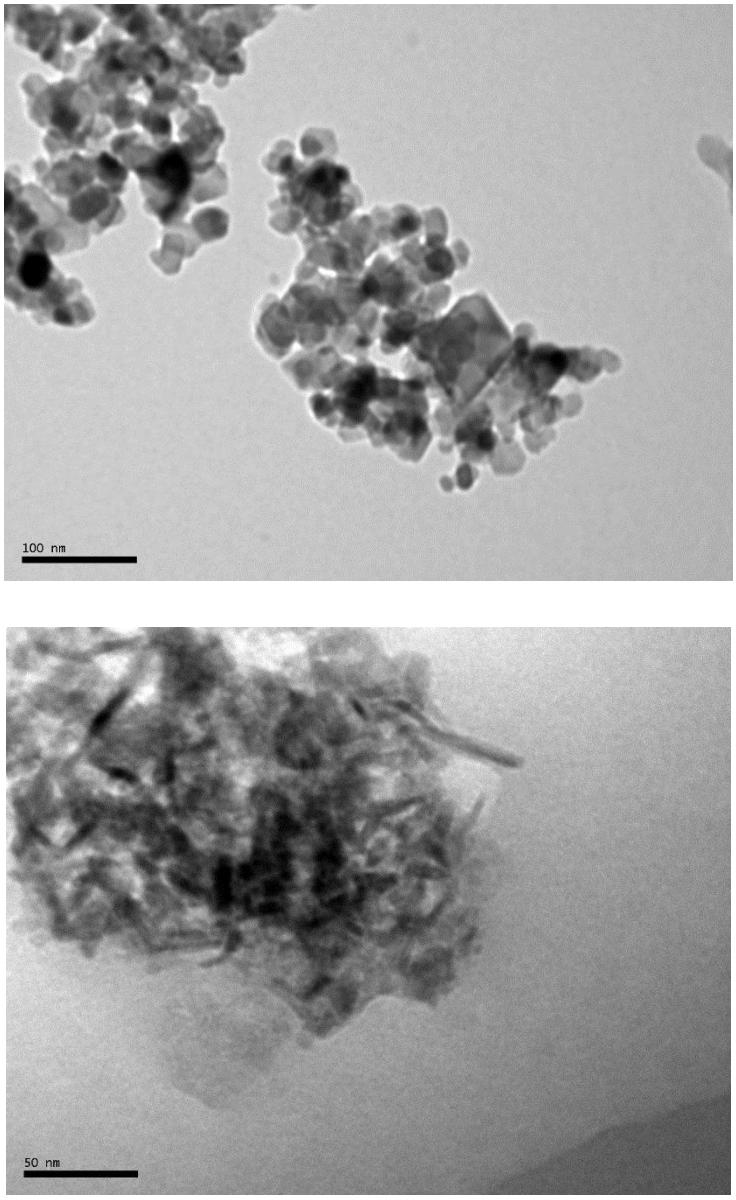

Figura 12. Nanopartículas de BSA-5% Mn, TEM-150000X (arriba) y 500000X (abajo)

2.3. Interacción de las nanopartículas de albúmina con diferentes metales

Dado que uno de los objetivos del presente trabajo es llevar a cabo la síntesis de nanopartículas capaces de ser empleadas como fases sensoras en la detección de metales, se estudió la interacción de estas nanopartículas con diferentes metales.

Para ello se emplearon las nanopartículas de BSA así como las nanopartículas de BSA dopadas tanto con KI como con Mn. Las nanopartículas de tiroxina se descartaron debido a que presentaron una mayor turbidez, lo cual podría dificultar las medidas de luminiscencia posteriores.

2.3.1 Nanopartículas de KI

Se observó que el Fe(III) actuaría como quencher (desactivador) de fluorescencia tanto en el caso de las nanopartículas de BSA como en el caso de las nanopartículas de BSA dopadas con KI. Por su parte, la Ag(I) muestra un comportamiento similar al aumentar la concentración de KI de 1 al 5% en las nanopartículas (*Figura 13*)

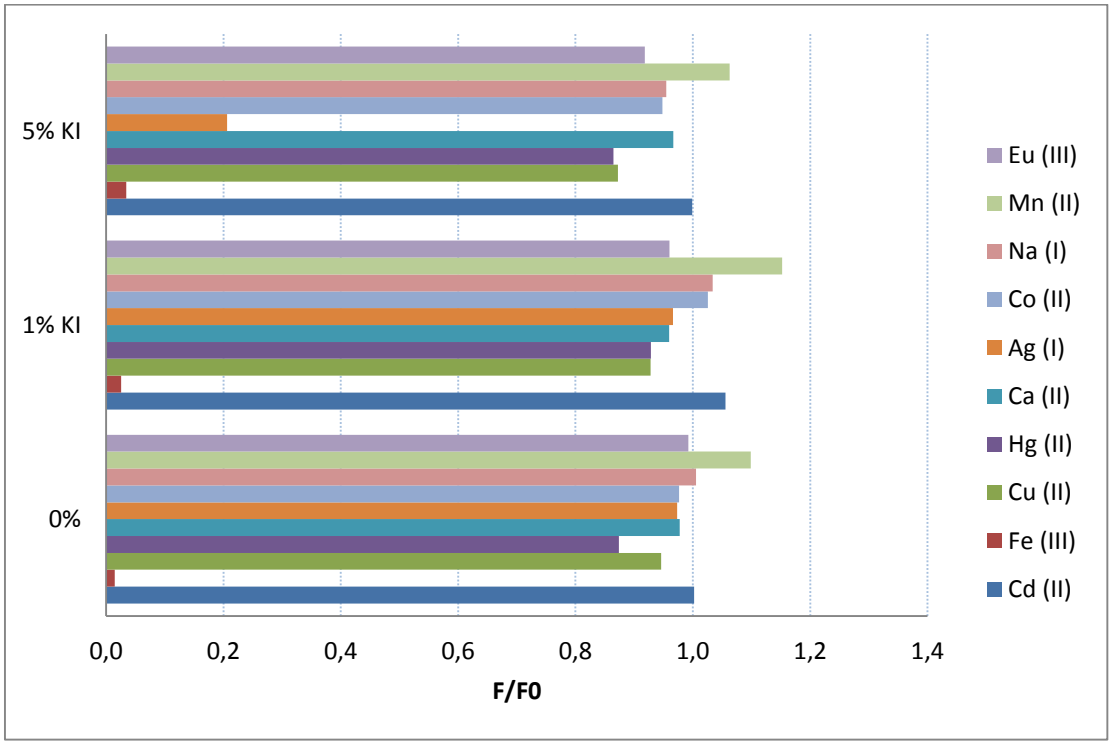

Figura13. Relación de intensidades de la interacción de las nanopartículas de albúmina y albúmina con 1% y 5% de KI, respectivamente, con distintos metales

Con el objetivo de estudiar el comportamiento de la plata, se realizaron pruebas adicionales empleando distintas concentraciones de Ag (I) entre $4x10^{-4}$M y $8x10^{-3}$M. Tal y como puede observarse en la *Figura 14*, la relación de intensidades F_0/F aumenta a medida que aumentamos la concentración de Ag (I) en el caso de las nanopartículas con 5% de KI, mientras que permanece prácticamente invariable en el caso de las otras dos.

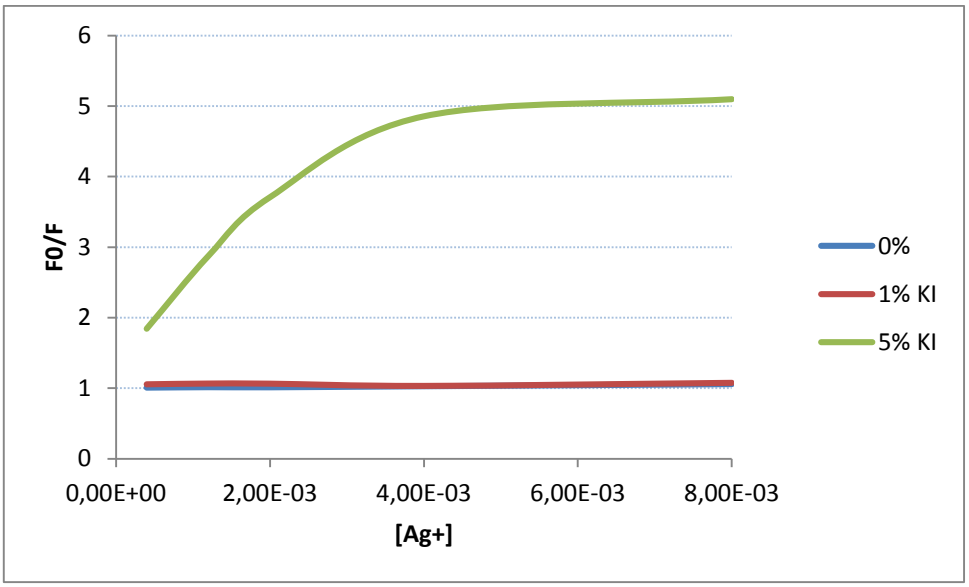

Figura 14. Relación de intensidades de la interacción de las nanopartículas de albúmina y albúmina con 1% y 5% de KI, respectivamente, con distintas concentraciones de Ag(I)

2.3.2 Nanopartículas de Mn

Se emplearon las nanopartículas de 1 y 5% de manganeso para realizar las pruebas con metales. Nuevamente, la relación F/F_0 se anula en presencia de Fe (III). En este punto, se decidió incluír en este estudio la interacción de estas nanopartículas con Fe (II), no observándose quenching en este caso. Por tanto, estas nanopartículas serían capaces de discriminar entre Fe (II) y Fe (III). En la *Figura 16* se puede observar como la relación de intensidades (F0/F) producida por la interacción de estas nanopartículas con

distintas concentraciones de Fe (III) aumenta a medida que la concentración de Fe(III) también aumenta, observándose una ligera desviación positiva en los resultados obtenidos.

En el caso del Hg (II) el hecho de que la relación F/F_0 se anule se atribuye a la elevada dispersión que presentó la muestra, probablemente debida a la precipitación del Hg^{2+}. cátion estable en medios muy ácidos (con pH inferiores a 2). Dado que el pH de nuestras nanopartículas es superior, es posible que el mercurio se hidrolice formando monohidroxomercurio(II), precipitando posteriormente a hidróxido de mercurio (II), $Hg(OH)_2$. [47]

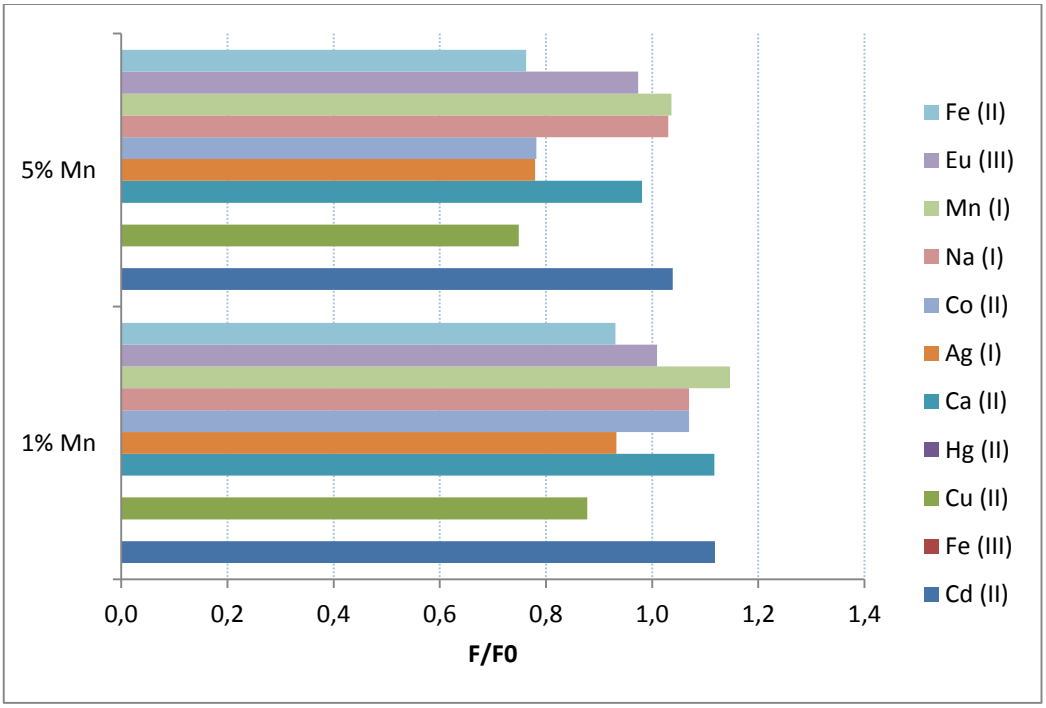

Figura 15. Relación de intensidades de la interacción de las nanopartículas de albúmina con 1% y 5% de Mn, respectivamente, con distintos metales

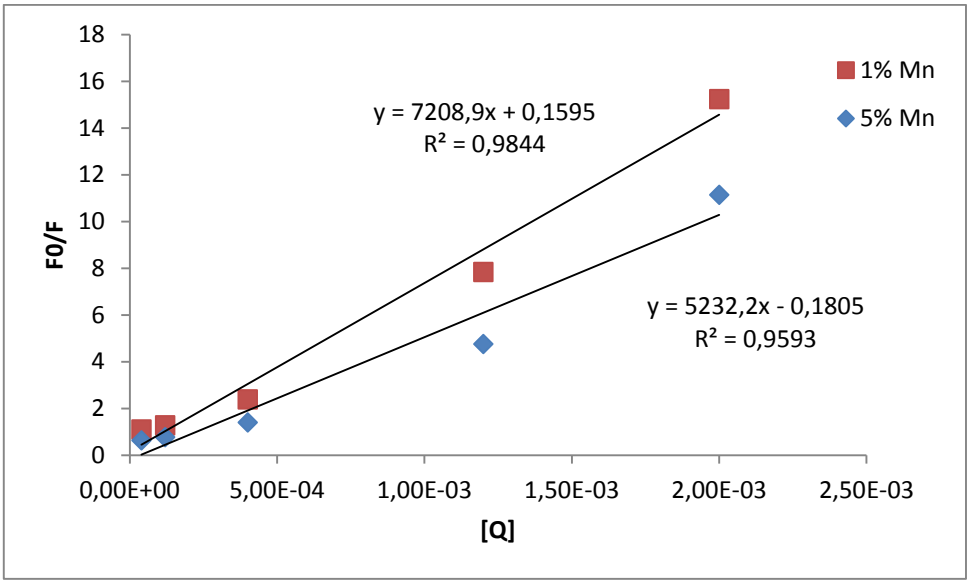

Figura 16. Stern-Volmer relación intensidad de fluorescencia de las nanopartículas de 1 y 5% de Mn con Fe(III)

Posteriormente se analizó la interacción de estas nanopartículas con distintos aniones, empleando para ello disoluciones que contenían como contraión sodio. Tal y como se puede observar en la *Figura 17*, no se observó la existencia de efectos desactivantes al variar el anión, excepto en el caso del nitrito de sodio, donde se observa una clara disminución de intensidad F/F0.

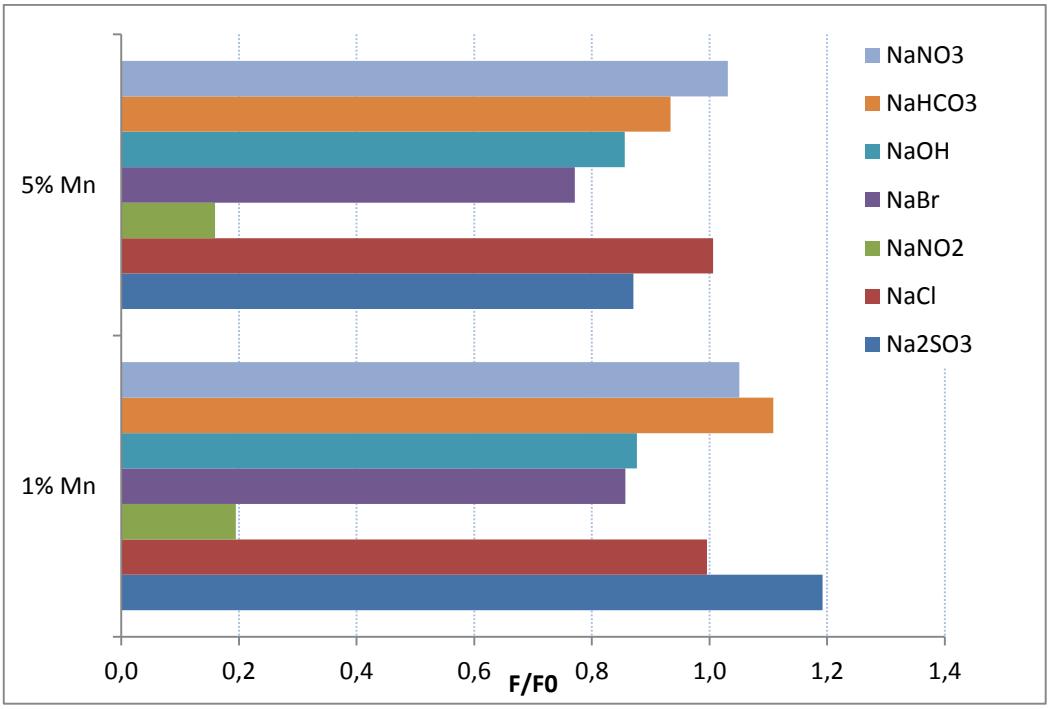

Figura 17. Relación de intensidades de la interacción de las nanopartículas de albúmina con 1% y 5% de Mn, respectivamente, con distintos aniones de sodio

Para estudiar el efecto que puede tener la variación del porcentaje de manganeso durante la síntesis de las nanopartículas sobre su capacidad como fase sensora de metales, se evaluó la relación de intensidades producida por la interacción de distintas nanopartículas de manganeso (entre 5 y 20% de Mn) con distintas concentraciones de Fe (III). Como puede observarse, en todos los casos aumenta la relación F0/F a medida que la concentración de Fe(III) aumenta, mientras que permanece prácticamente constante en el caso de las pruebas realizadas con Fe(II), en el mismo rango de concentraciones (*Figura 18*). Se realizaron además curvas de calibrado de las nanopartículas de Mn con distintas concentraciones de Fe(III) (*Figura 19*).

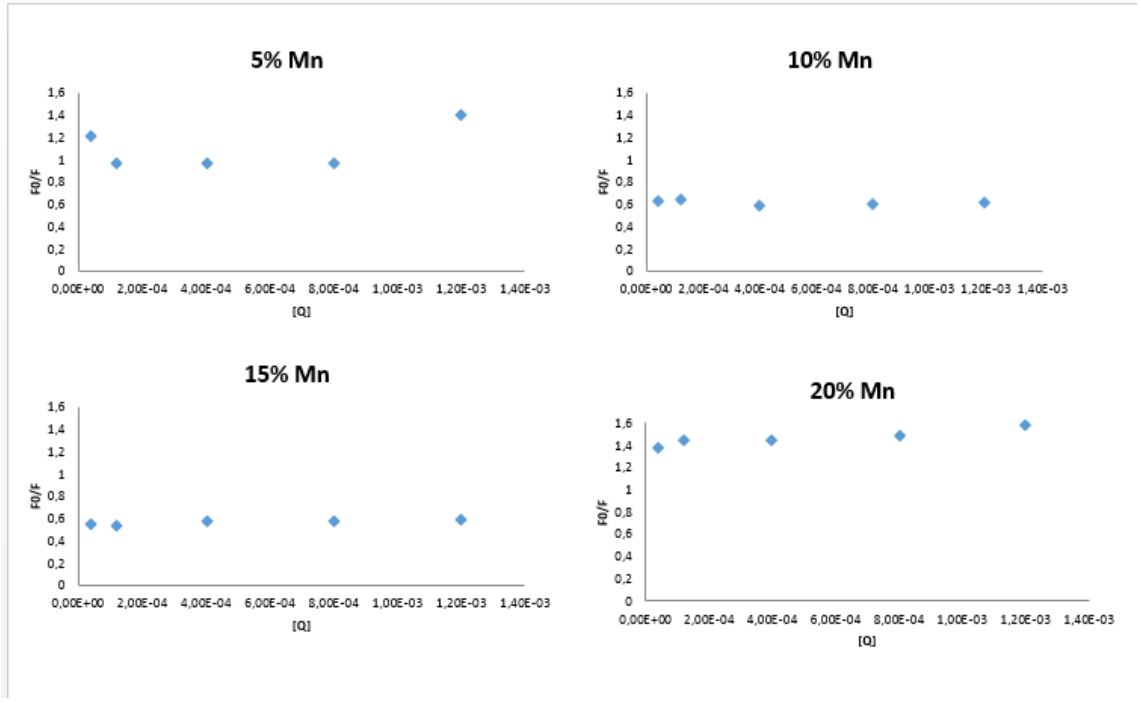

Figura 18. Stern Volmer, relación de intensidades de la interacción de las nanopartículas de albúmina y Mn con distintas concentraciones de Fe(II)

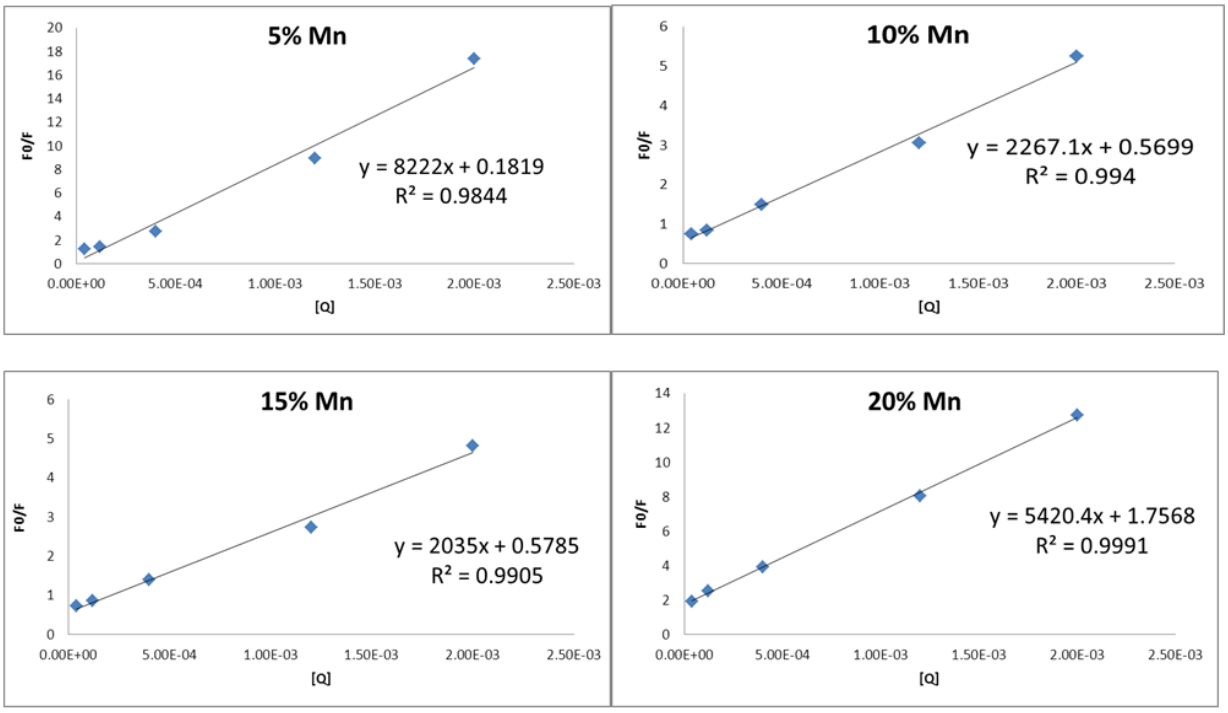

Figura 19. Stern-Volmer, relación intensidad de fluorescencia de las nanopartículas de Mn con distintas concentraciones de Fe(III)

Se realizó el mismo estudio empleando esta vez como analitos los aniones NO_3^- y NO_2^-, en lugar de Fe (II) y Fe (III), para estudiar el efecto discriminatorio que podrían tener estas nanopartículas entre diferentes estados de oxidación. En este caso, las relaciones de intensidad de fluorescencia (F0/F) aumentan nuevamente a medida que aumentan las concentraciones de NO_2^-, mientras que permanecen prácticamente constantes en presencia de NO_3^- en el mismo rango de concentración (*Figura 20*).

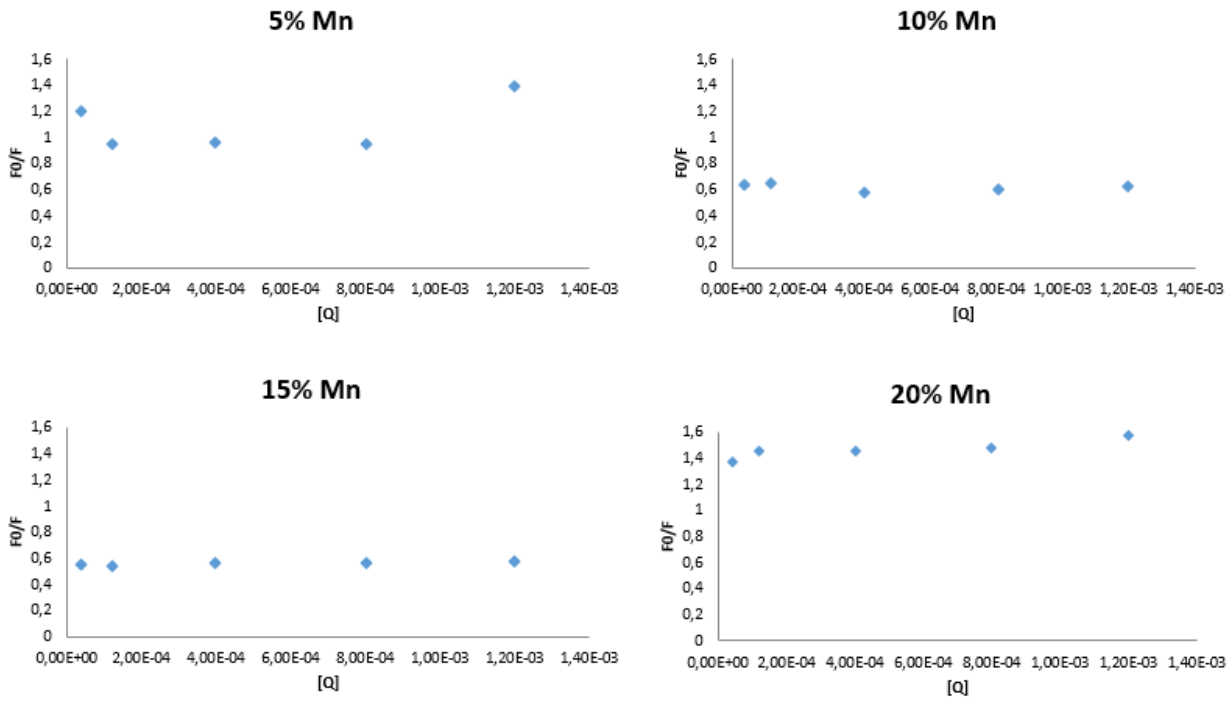

Figura 20. Stern Volmer, relación de intensidades de la interacción de las nanopartículas de albúmina y Mn con distintas concentraciones de NO_3^-

Se realizaron las correspondientes curvas de calibrado de las nanopartículas de Mn con distintas concentraciones de NO_2^-, obteniéndose los mejores coeficientes de correlación en el caso de las nanopartículas que contenían un 5 o un 20% de Mn.

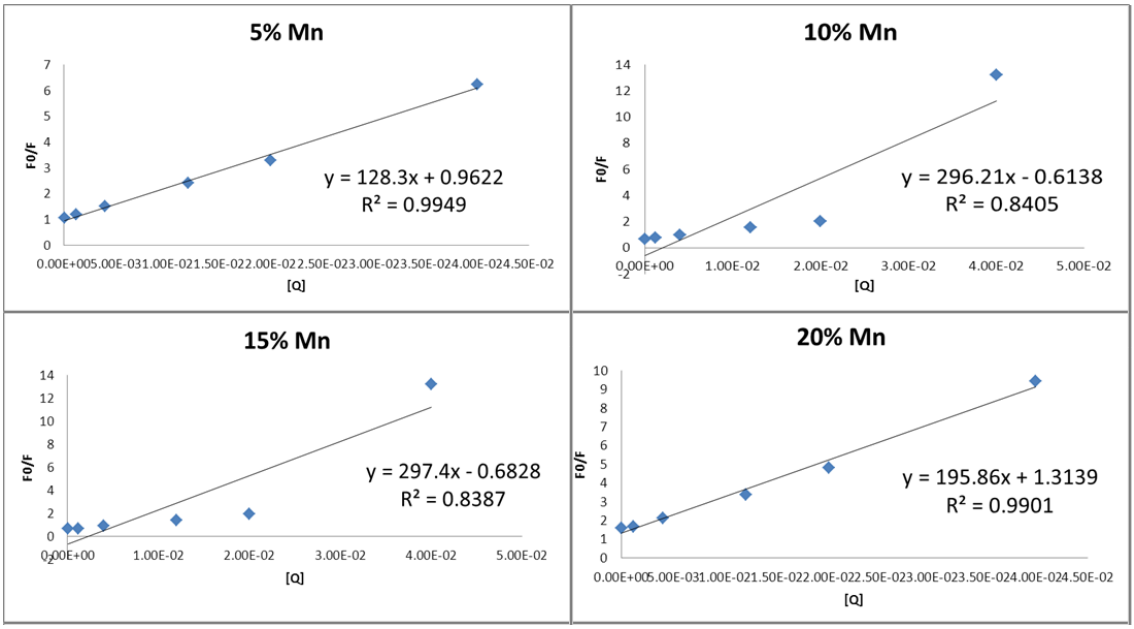

Figura 21. Stern-Volmer relación intensidad de fluorescencia de las nanopartículas de Mn con distintas concentraciones de NO_2^-

3. Nanopartículas de glutatión

Para intentar reducir o eliminar estas estructuras cilíndricas alargadas de carbono sobre la que se situaban algunas de las nanopartículas de BSA se sintetizaron nanopartículas a partir de glutatión, un tripéptido constituído únicamente por tres aminoácidos: cisteína, glutamato y glicina. Se espera que partiendo de un compuesto más pequeño, la formación de estos cilindros alargados no tenga lugar. Además, dado que la luminiscencia intrínseca de la BSA permanecía en las nanopartículas obtenidas a partir de esta proteína, probablemente como consecuencia de su presencia residual en las mismas, se intentó sintetizar nuevas nanopartículas a partir de glutatión, un péptido sencillo no luminiscente, capaz de actuar como fuente de carbono y nitrógeno.

3.1. Caracterización espectroscópica

Las nanopartículas sintetizadas a partir de glutatión y ácido cítrico presentan un máximo a una λ_{exc}=320nm y a una λ_{em}=450nm.

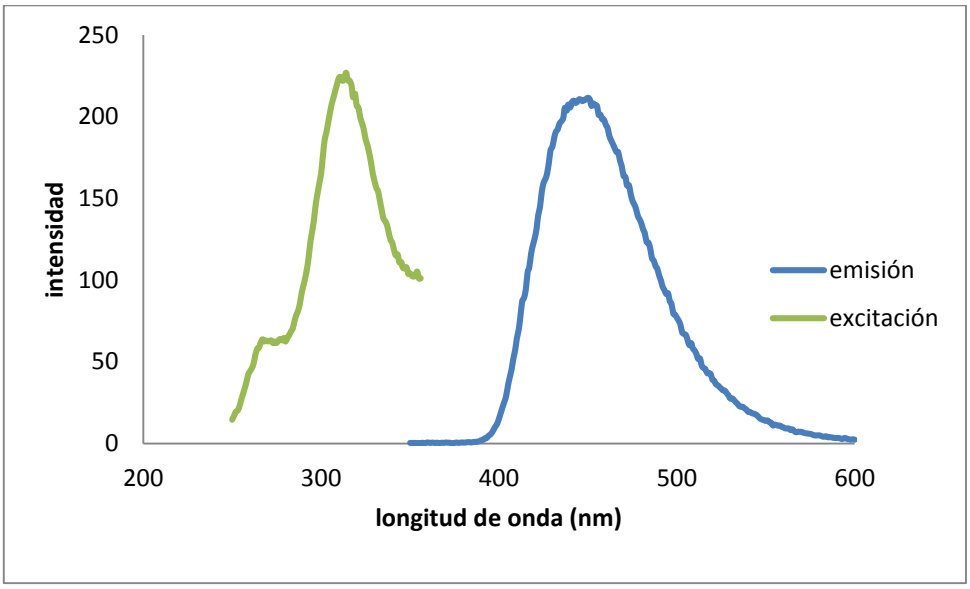

Figura 22. Espectro de emisión y excitación fluorescente de las nanopartículas de glutatión 1% Mn (λ_{exc}=320nm, λ_{em}=450nm)

Tomando como base los resultados obtenidos para las nanopartículas de BSA, se emplearon nuevamente concentraciones de manganeso de entre el 1 y el 20%, para la síntesis de estas nanopartículas.

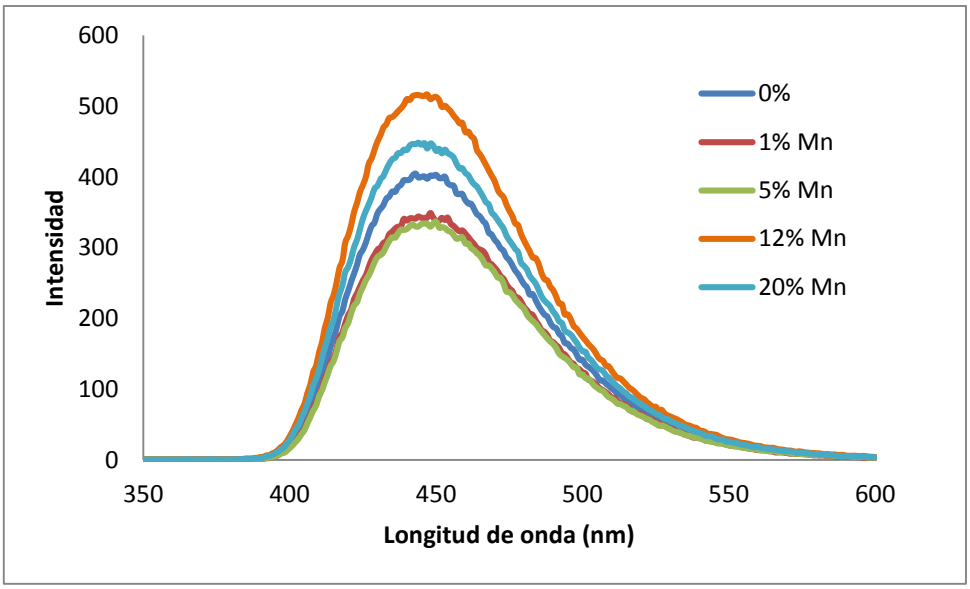

Figura 23. Espectro de emisión fluorescente de las nanopartículas de glutatión (λ_{exc}=320nm)

3.2. Caracterización microscópica

Las nanopartículas sintetizadas a partir de glutatión mostraron diámetros entre los 9 y los 25 nm, organizados todos ellos sobre una especie de red de carbono.

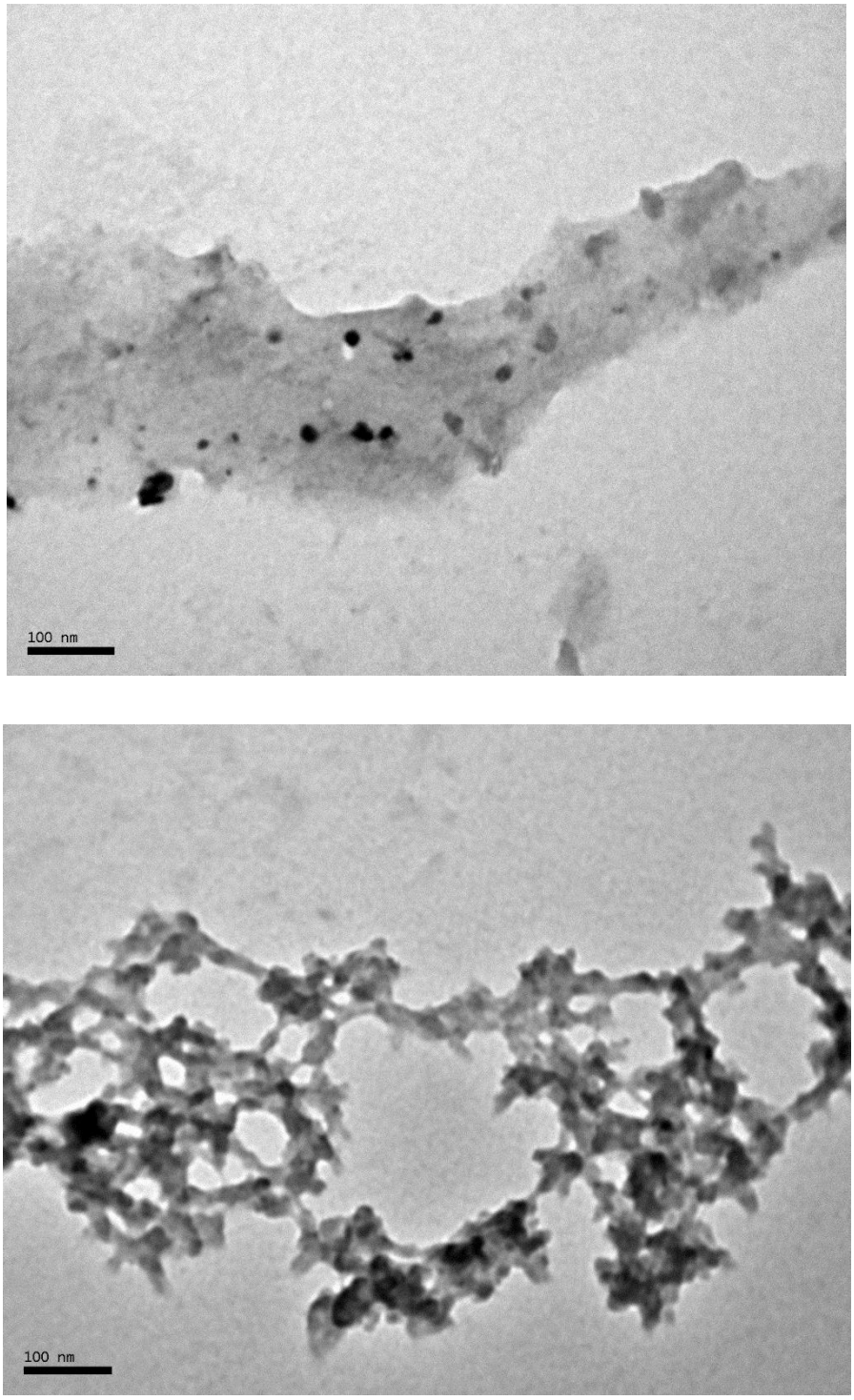

Figura 24. Nanopartículas de Glutatión-1% Mn dializadas, TEM-100000X

Se observaron además las mismas nanopartículas sin dializar, encontrándose partículas esféricas de tamaño próximo a los 100 nm, muy dispersas.

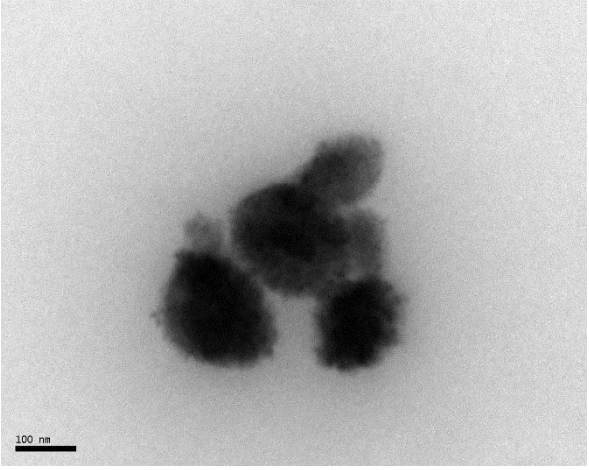

Figura 25. Nanopartículas de Glutatión-1% Mn sin dializar, TEM-100000X

3.3. Interacción de las nanopartículas de glutatión sintetizadas en microondas con diferentes metales

Los estudios de interacción de estas nanopartículas con metales se llevaron a cabo empleando las nanopartículas con 1% y 5% de manganeso. En este caso el Fe (III) vuelve a mostrarse como claro elemento desactivante de fluorescencia, al igual que la Ag (I) o el Hg (II). Según los estudios preliminares, estos dos últimos metales producen una desactivación más eficaz puesto que se requiere menor concentración para lograr una misma disminución de la intensidad de fluorescencia. En el caso de los distintos aniones, las pruebas realizadas muestran que los nitritos ejercen también un efecto desactivante de la fluorescencia en estas nanopartículas (*Figura 27*).

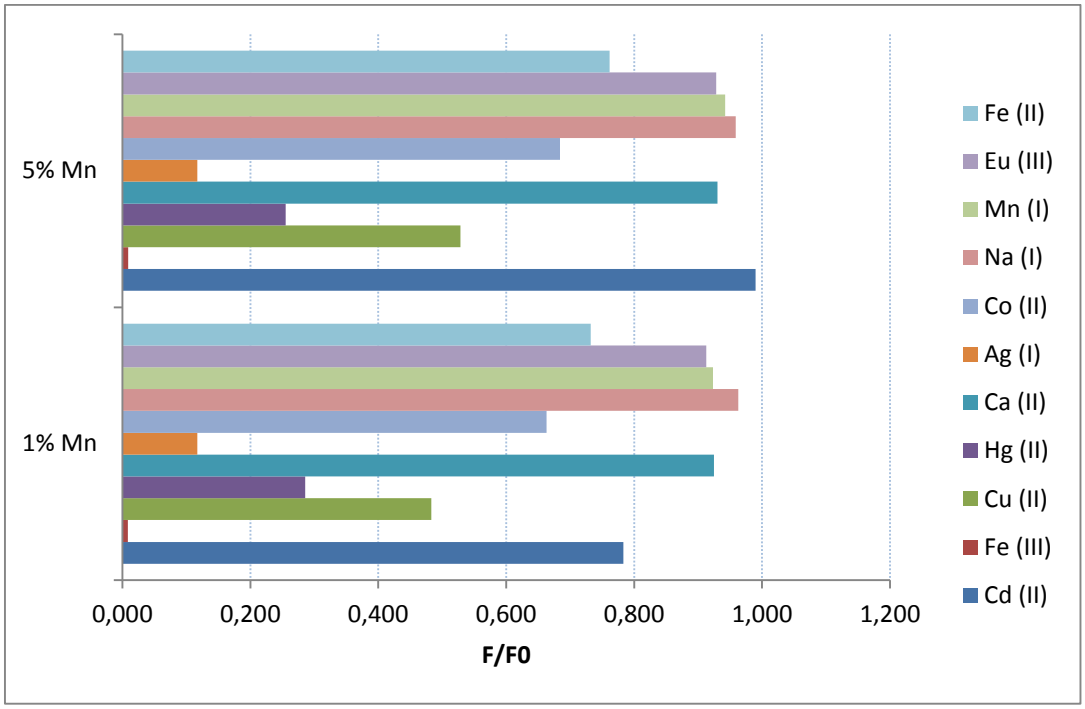

Figura 26. Relación de intensidades de la interacción de las nanopartículas de glutatión y Mn con distintos metales

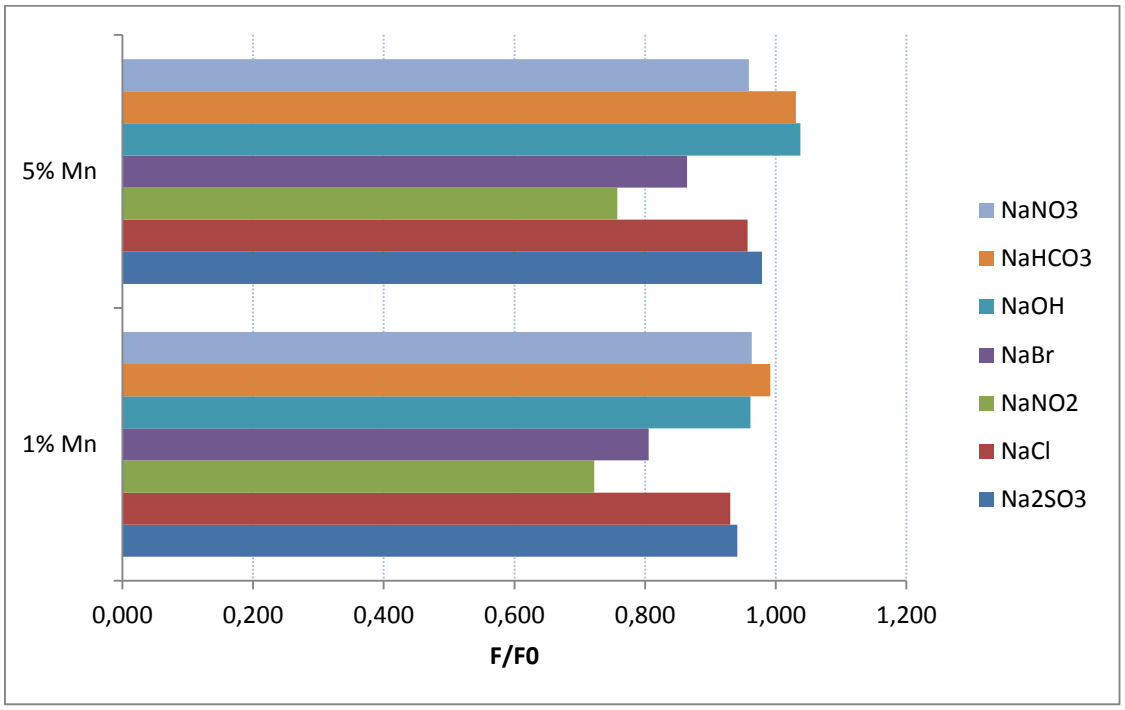

Figura 27. Relación de intensidades de la interacción de las nanopartículas de glutatión con 1% y 5% de Mn, respectivamente, con distintos aniones de sodio

Se realizaron las correspondientes curvas de calibrado de las nanopartículas de Mn con distintas concentraciones de Fe (III) [1'2x10^{-4} - 1'2x10^{-4} M], NO_2^- [4x10^{-3} - 8x10^{-2} M], Ag (I) [4x10^{-5} - 4x10^{-3} M] y Hg (II) [1'2x10^{-3} - 1'2x10^{-2} M]. Los resultados obtenidos se muestran a continuación.

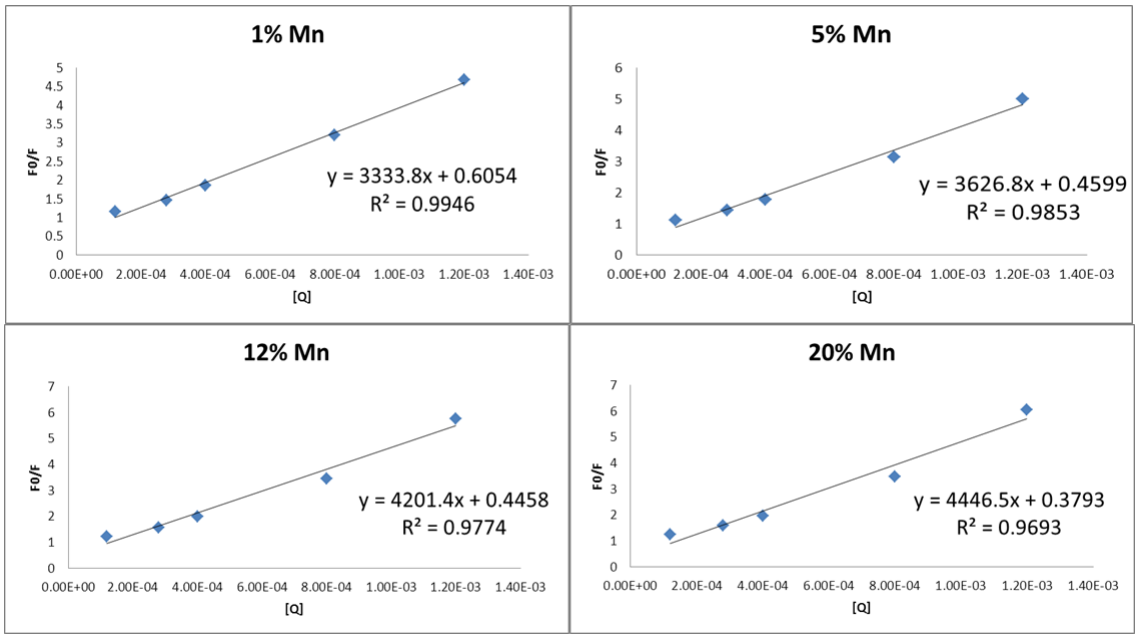

Figura 28. Stern-Volmer relación intensidad de fluorescencia de las nanopartículas de glutatión y Mn con distintas concentraciones de Fe(III)

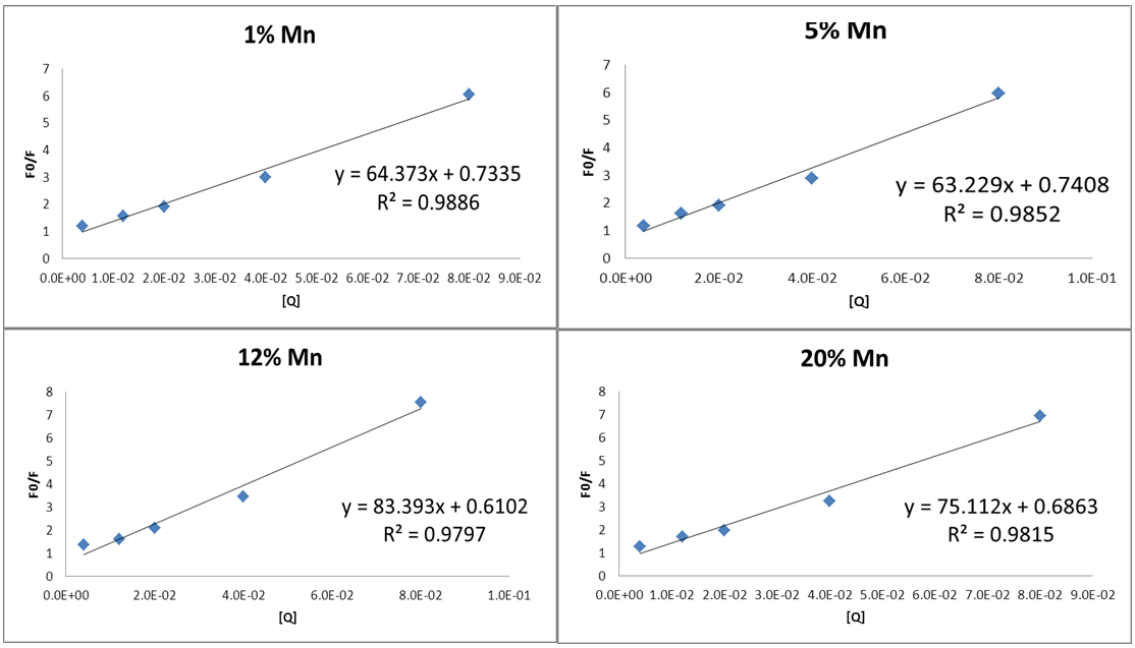

Figura 29. Stern-Volmer relación intensidad de fluorescencia de las nanopartículas de glutatión y Mn con distintas concentraciones de NO_2^-

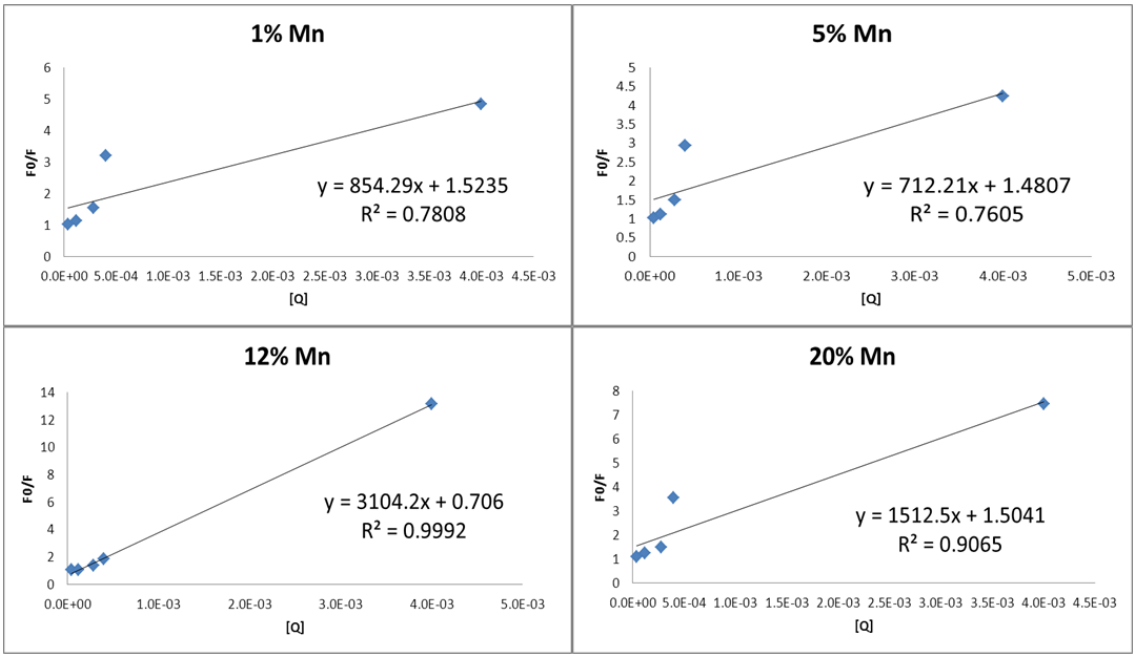

Figura 30. Stern-Volmer relación intensidad de fluorescencia de las nanopartículas de glutatión y Mn con distintas concentraciones de Ag (I)

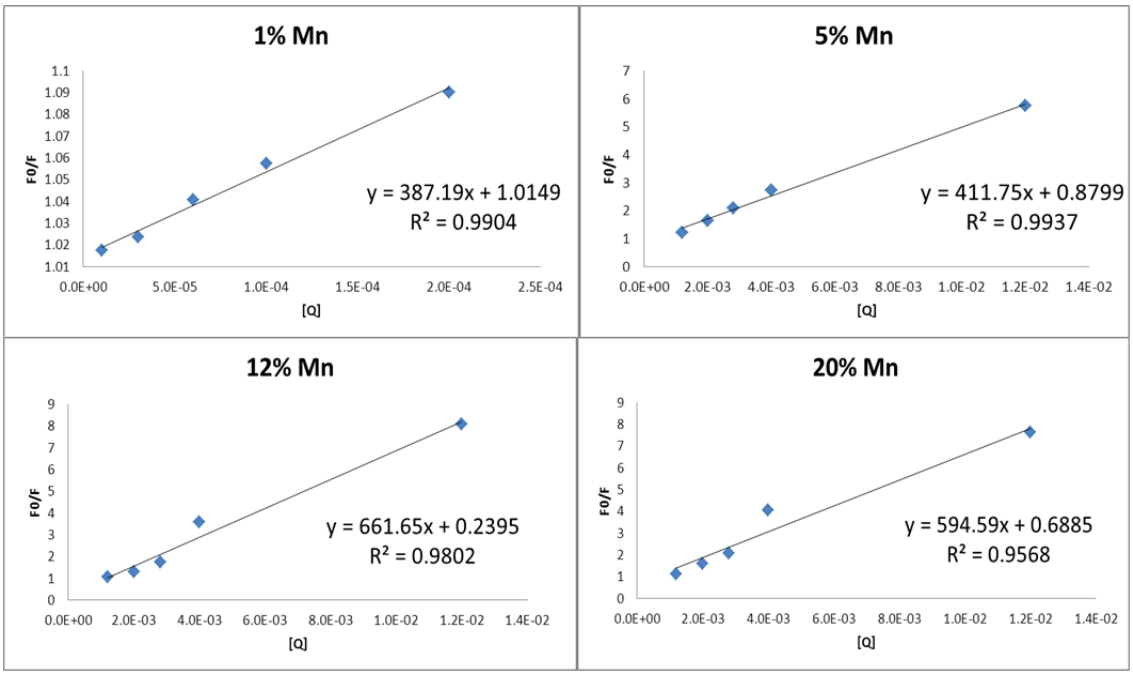

Figura 31. Stern-Volmer relación intensidad de fluorescencia de las nanopartículas de glutatión y Mn con distintas concentraciones de Hg (II)

3.4. Variación de la intensidad relativa de fluorescencia según la concentración de nanopartículas añadida

De forma adicional se estudió cómo varía la intensidad de fluorescencia con el volumen de nanopartículas añadidas a la muestra, empleando para ello las nanopartículas de glutatión 1% de y una concentración fija de NO_2^- igual a $4x10^{-3}$ M. Tal y como puede observarse en la *Figura 32*, la intensidad disminuye a medida que la cantidad de nanopartículas añadida aumenta. Esto indica que aumentando el volumen de nanopartículas sería posible alcanzar límites de detección de metales más bajos.

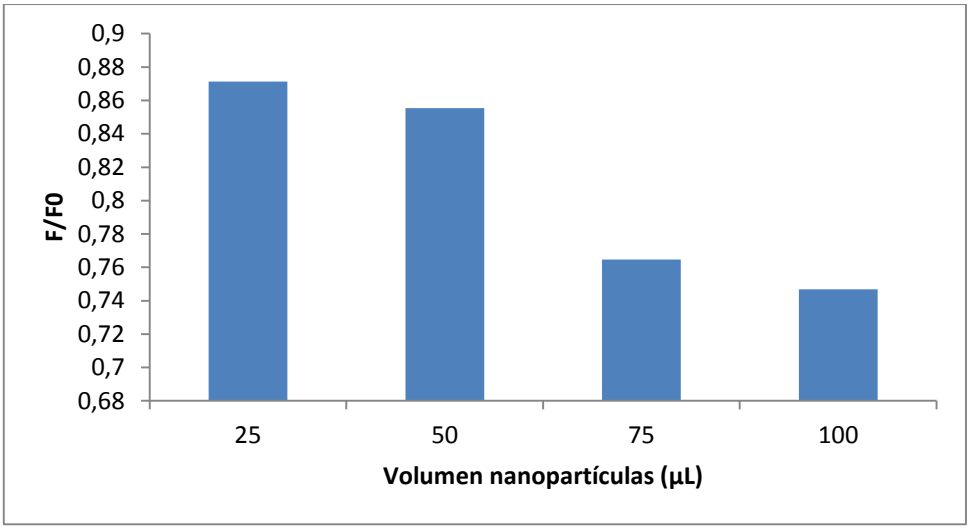

Figura 32. Variación de la intensidad relativa de fluorescencia según el volumen de nanopartículas añadida para una concentración de $4x10^{-3}$ M de NO_2^-

3.5. Nanopartículas de glutatión sintetizadas en estufa

Con el objetivo de estudiar cómo afecta el método de síntesis a las características de las nanopartículas sintetizadas, se realizó una segunda síntesis de las nanopartículas de glutatión con un 1% de Mn, empleando esta vez un método más agresivo de síntesis.

Estas nanopartículas presentaron las mismas características espectroscópicas que las obtenidas al realizar su síntesis mediante microondas, con un máximo de emisión cuando la disolución es excitada a una λ_{exc}=320nm, y uno de excitación a λ_{em}=450nm.

Se caracterizaron microscópicamente y se estudió tanto su interacción con los metales como con los aniones previamente mencionados.

3.5.1. Caracterización microscópica

Se observó una elevada cantidad de nanopartículas esféricas, con diámetros de alrededor de los 100 nm.

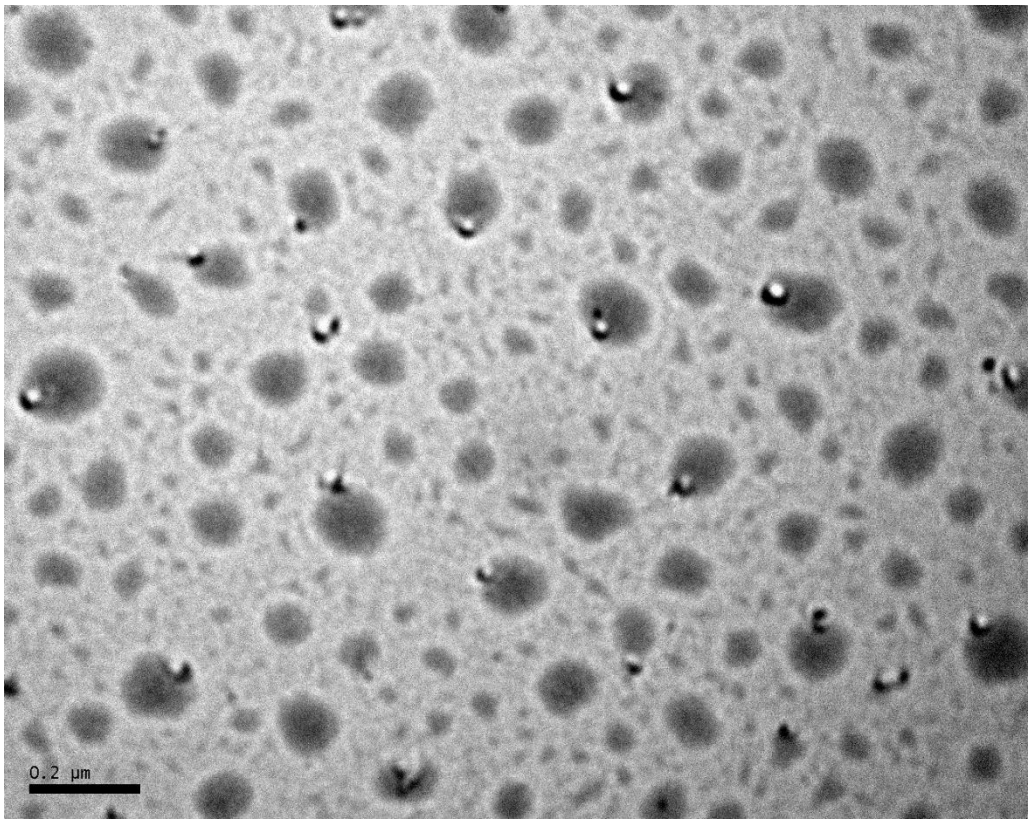

Figura 33. Nanopartículas de glutatión (1% Mn) sintetizadas en estufa (TEM-50000X)

3.5.2. Interacción de las nanopartículas de glutatión sintetizadas en estufa con diferentes metales

Los resultados obtenidos tanto en el caso de las interacciones con metales como con aniones son similares a los obtenidos al emplear las mismas nanopartículas sintetizadas en microondas, tal y como puede observase a continuación.

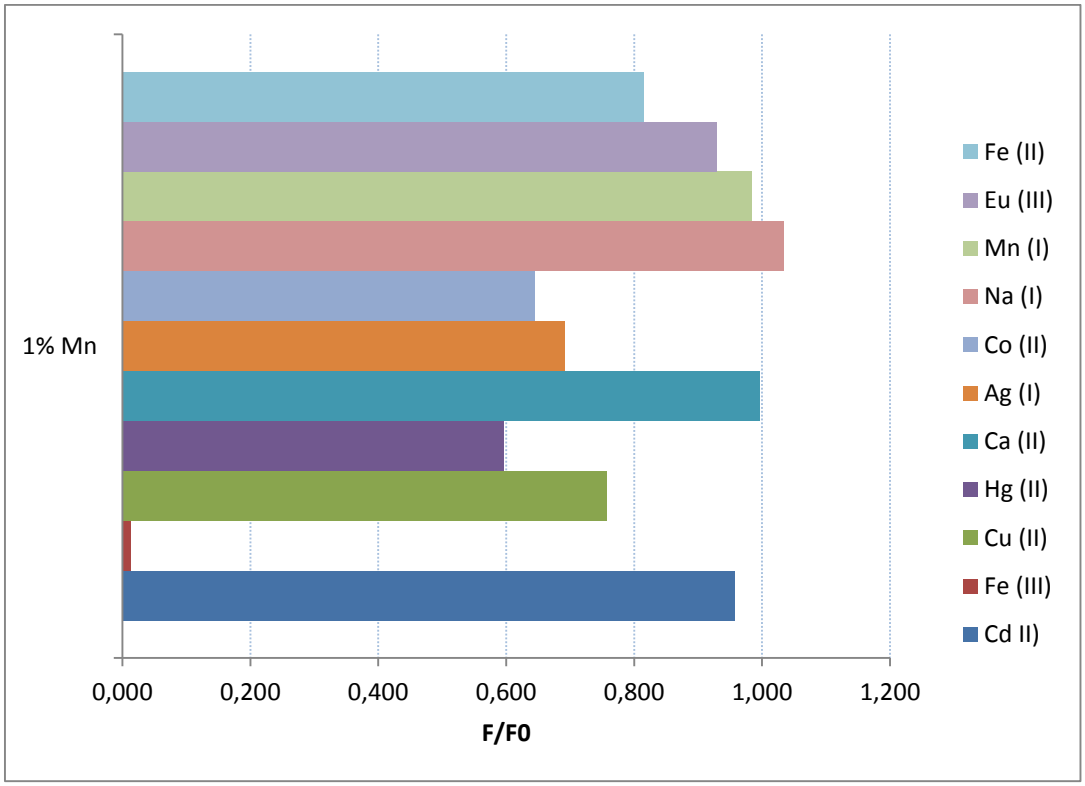

Figura 34. Relación de intensidades de la interacción con distintos metales de las nanopartículas de glutatión (1% Mn) sintetizadas en estufa

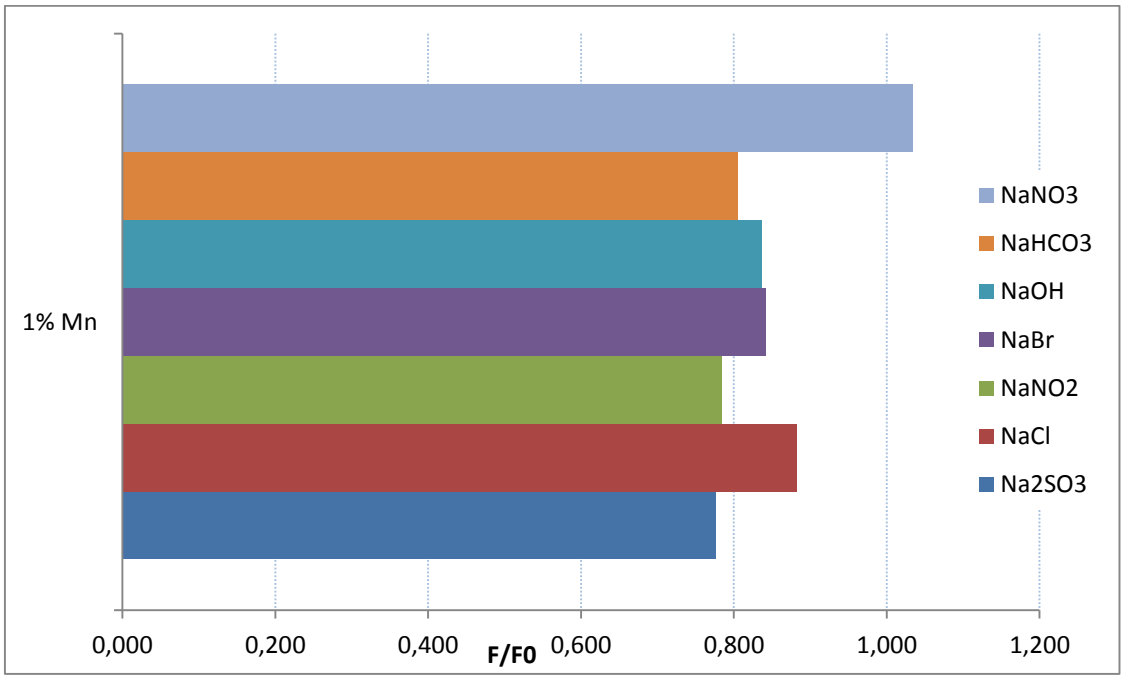

Figura 35. Relación de intensidades de la interacción con distintos aniones de sodio de las nanopartículas de glutatión (1%Mn) sintetizadas en estufa

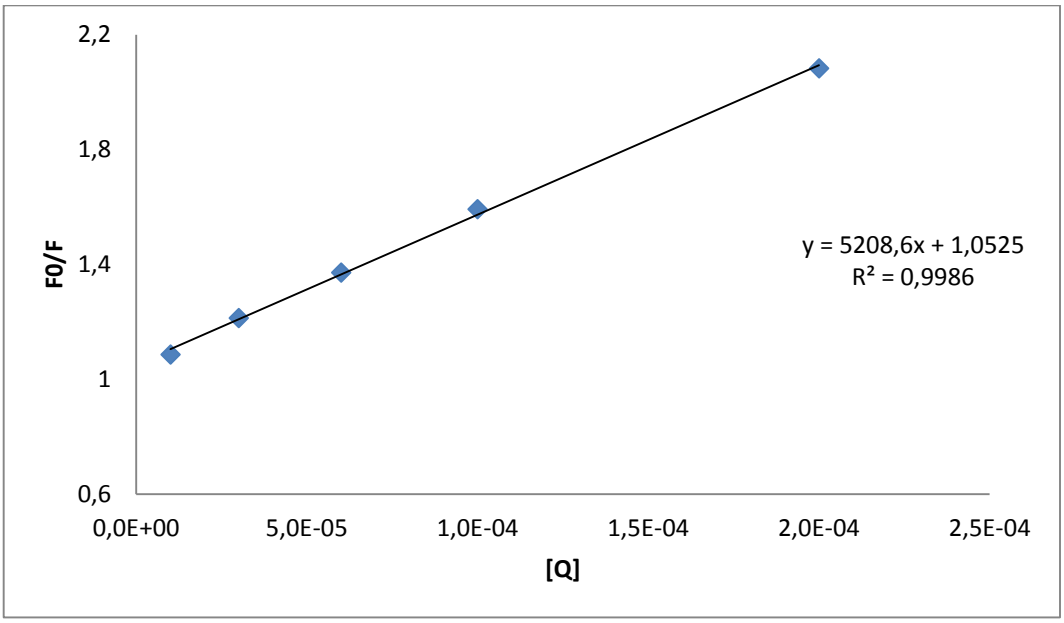

Figura 36. Stern-Volmer relación intensidad de fluorescencia de las nanopartículas de glutatión (1% Mn) con distintas concentraciones de NO_2^-

4. Nanopartículas de productos naturales

Finalmente, se llevó a cabo la síntesis de Onion Dots por medio de un método de carbonización térmica, empleando como fuentes de carbono productos naturales con un alto contenido de licopeno. Para ello se emplearon zumos de zanahoria y de dos tipos diferentes de tomate: tomate bola y tomate kumato.

Se llevó a cabo la caracterización microscópica de estas nanopartículas, observándose que presentaron un tamaño del orden de los 40 nm.

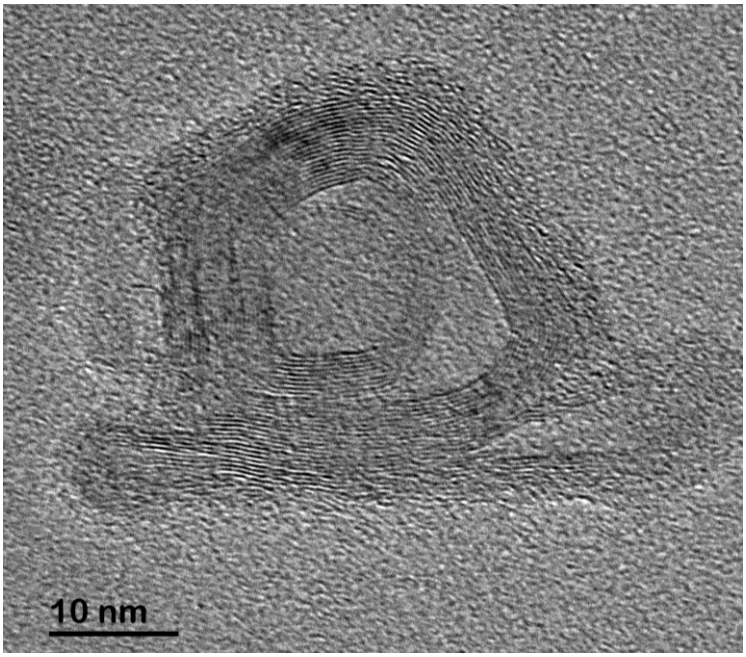

Figura 37. Onion Dot sintetizado a partir de tomate kumato (HR-TEM)

5. Muestras reales

Se emplearon las nanopartículas de glutatión con un 1% de manganeso sintetizadas en microondas para analizar la capacidad de estas nanopartículas de actuar como fases sensoras para el análisis de nitritos.

Tanto los nitratos como los nitritos son compuestos iónicos que se encuentran en la naturaleza, formando parte del ciclo del nitrógeno. Su concentración en aguas no suele ser muy elevada, pero puede incrementarse debido a las prácticas agrícolas o a la presencia de residuos urbanos y ganaderos. El nitrato se emplea principalmente en la industria de los fertilizantes, mientras que el nitrito lo hace como aditivo alimentario (E-249, nitrito potásico, E-250, nitrito sódico). Por lo general, niveles elevados de nitratos en aguas potables se deben a la contaminación de las aguas subterráneas, procedientes de un uso excesivo de fertilizantes, residuos animales, etc. Los microorganismos presentes en el suelo, el drenaje y el agua transforman los nitratos en nitritos. [48,49]

Una vez en el organismo, los nitritos transforman el Fe^{2+} de la hemoglobina en Fe^{3+}, impidiendo de esta forma que la hemoglobina sanguínea pueda unir oxígeno, causando metaglobinemia. [50]

El nivel de concentración máximo admisible de nitratos en aguas potables es de 45 mg/L (ppm), mientras que el de nitritos es de 3’3 mg/L (ppm). [50]

En este caso, se analizó el agua procedente de dos fuentes de agua natural, así como una tercera muestra de agua estancada (próxima a otra de estas fuentes).

Reproducibilidad

Se analizó la reproducibilidad del método midiendo la intensidad relativa alcanzada empleando una concentración fija de NO_2^- igual a 10^{-4} M, obteniéndose una desviación estándar relativa (%RSD) del 0’84% (n=12).

CONCLUSIONES

Se evaluó el intervalo dinámico lineal y el límite de detección de BSA mediante fosforescencia a temperatura ambiente, estableciendo dicho intervalo entre 10^{-6} y 10^{-5} M y obteniendo un límite de detección de 8'5x10^{-7} M.

Se llevó a cabo la síntesis de nanopartículas (C-Dots) empleando dos precursores diferentes, ambos capaces de actuar simultáneamente como fuente de carbono y nitrógeno: BSA y glutatión. Con el objetivo de intentar que estas nanopartículas presentasen fosforescencia, se doparon durante su síntesis con distintos elementos: tiroxina, KI, europio o manganeso. Las nanopartículas sintetizadas se caracterizaron espectroscópica y microscópicamente.

Se optimizaron los parámetros de fosforescencia mediante la adición de una concentración adecuada de KI y Na_2SO_3. A pesar de ello no se consiguió que ninguna de las nanopartículas sintetizadas presentase fosforescencia.

Se realizaron estudios de interacción de las nanopartículas sintetizadas con distintos metales, las cuales mostraron capacidad de discriminar entre elementos metálicos con distintos estados de oxidación, como son Fe (II) y Fe (III) o NO_2^- y NO_3^-, en un mismo intervalo de concentraciones.

Se comprobó que las nanopartículas sintetizadas podrían ser empleadas como fases sensoras para metales en muestras de matriz sencilla.

Adicionalmente, se sintetizaron Onion Dots a través de un método de carbonización térmica, empleando como fuentes de carbono productos naturales con un alto contenido de licopeno.

BIBLIOGRAFÍA

[1] **"Carbon nanostructures"**, Shenderova O.A, Zhirnov V.V., Brenner D.W., Critical Reviews in Solid State and Materials sciencies 27 (2002) 227-356.

[2] **"Synthesis and characterization of graphene and carbon nanotubes: A review on the past and recent developments"** Liu W.W. et al., Journal of Industrial and Engineering Chemistry 20 (2014) 1171–1185.

[3] **"Recent advances in bioapplications of C-dots"** Zhao A., Chen Z., Zhao C., Gao N., Ren J., Qu X., Carbon 85 (2015) 309-327.

[4] **"Curling and closure of graphitic networks under electron-beam irradiation",** Ugarte D., Nature 359 (1992) 707-709.

[5] **"Carbon onions: synthesis and electrochemical applications",** McDonough J.K., Gogotsi Y., Electrochemical Society Interface, 2013.

[6] **"Electrophoretic analysis and purification of fluorescent single-walled carbon nanotube fragments"** Xu X, Ray R, Gu Y, Ploehn HJ, Gearheart L, Raker K, et al., Journal of American Chemical Society 126 (2004) 12736-12737.

[7] **"Electrochemiluminescence of water-soluble carbon nanocrystals released electrochemically from graphite"** Zheng L., Chi Y., Dong Y., Lin J., Wang B., Journal of American Chemical Society 131 (2009) 4564-4565.

[8] **"Facile preparation of low cytotoxicity fluorescent carbon nanocrystals by electrooxidation of graphite",** Zhao Q.L., Zhang Z.L., Huang B.H., Peng J., Zhang M., Pang D.W., Chemical Communications (2008) 5116-5118.

[9] **"Luminescence properties of boron and nitrogen doped graphene quantum dots prepared from arc-discharge-generated doped graphene samples"**, Dey S., Govindaraj A., Biswas K., Rao C. N. R., Chemical Physics Letters, 595-596 (2014) 203-208.

[10] **"One-step synthesis of fluorescent carbon nanoparticles by laser irradiation"** Hu S.L., Niu K.Y., Sun J., Yang J., Zhao N.Q., Du X.W., Journal of Materials Chemistry 19 (2009) 484–488.

[11] **"Preparation of carbon quantum dots with tunable photoluminescence by rapid laser passivation in ordinary organic solvents"** Li X., Wang H., Shimizu Y., Pyatenko A., Kawaguchi K., Koshizaki N., Chemical Communications 47 (2011) 932-934.

[12] **"Hg(II) sensing based on functionalized carbon dots obtained by direct laser ablation"** Gonçalves H., Jorge P.A.S., Fernandes J.R.A., Esteves da Silva J.C.G., Sensors and Actuators B 145 (2010) 702–707.

[13] "**Hydrothermal synthesis of two photoluminescent nitrogen-doped graphene quantum dots emitted green and khaki luminescence",** Zhu X., Zuo X., Hu R., Xiao X., Liang Y., Nan J., Materials Chemistry and Physics 147 (2014) 963-967.

[14] **"One-pot synthesis of N-doped graphene quantum dots as a fluorescent sensing platform for Fe3+ ions detection"** Tam T.V., Trung N. B., Kim H. R., Chung J. S., Choi W.M., Sensors and actuators B: chemical 202 (2014) 568-573.

[15] **"Easy synthesis of highly fluorescent carbon quantum dots from gelatin and their luminescent properties and applications"** Liang Q., Ma W., Shi Y., Li Z., Yang X., Carbon 60 (2013) 421-428.

[16] **"Synthesis of highly fluorescent nitrogen-doped graphene quantum dots for sensitive, label-free detection of Fe(III) in aqueous media**" Ju J., Chen W., Biosensors and Bioelectronics 58 (2014) 219-225.

[17] **"Synthesis of biocompatible and highly photoluminescent nitrogen doped carbon dots from lime: Analytical applications and optimization using response surface methodology"** Barati A., Shamsipur M., Arkan E., Hosseinzadeh L., Abdollahi H., Materials Science and Engineering 47 (2015) 325-332.

[18] **"Reduced state carbon dots as both reductant and stabilizer for the synthesis of gold nanoparticles"**, Wang X.L., Long Y.J., Wang Q.L., Zhang H.J., Huang X.X., Zhu R., Carbon 64 (2013) 499–506.

[19] **"Carbon dots from tryptophan doped glucose for peroxynitrite sensing**" Simões E., Esteves da Silva J., Leitão J., Analytica Chimica Acta 852 (2014) 174-180.

[20] **"Facile synthesis of nitrogen-doped carbon dots for Fe3+ sensing and cellular imaging"** Gong X., Lu W., Paau M.C., Hu Q., Wu X., Shuang S., Dong C., Choi M. M. F., Analytica Chimica Acta 861 (2015) 74-84.

[21] **"Ionic liquids as precursors for highly luminescent, surface-different nitrogen-doped carbon dots used for label-free detection of Cu^{2+}/Fe^{3+} and cell imaging",** Zhao A., Zhao C., Li M., Ren J., Qu X., Analytica Chimica Acta 809 (2014) 128-133.

[22] **"Microwave assisted one-step green synthesis of cell-permeable multicolor photoluminescent carbon dots without surface passivation reagents"** X.H. Wang, K.G. Qu, B.L. Xu, J.S. Ren, X.G. Qu, Journal of Materials Chemistry 21 (2011) 2445-2450.

[23] **"One-step ultrasonic synthesis of water-soluble carbon nanoparticles with excellent photoluminescent properties"** Li H.T., He X.D., Liu Y., Huang H., Lian S.Y., Lee S.T., et al., Carbon 49 (2011) 605-609.

[24] **“Rapid microwave synthesis of fluorescent hydrophobic carbon dots”** Mitra S., Chandra S., Kundu T., Banerjee R., Pramanik P., Goswami A., RSC Adv 2 (2012) 12129-12131.

[25] **“Solvent-free synthesis of sulfur-and nitrogen-co-doped fluorescent carbon nanoparticles from glutathione for highly selective and sensitive detection”**, Wang W., Lu Y., Huang H., Wang A., Chen J., Feng J., Sensos and Actuators B: Chemical 202 (2014) 741-747.

[26] **“Carbon based dots co-doped with nitrogen and sulfur for high quantum yield and excitation-independent emission”** Dong Y., Pang H., Yang H.B., Guo C., Shao J., Chi Y., et al., Angewandte Chemie Internationl Edition in English 52 (2013) 7800-7804.

[27] **“Non-enzymaticbrowning-reaction: a versatile route for production of nitrogen-doped carbon dots with tunable multicolour luminescent display”** Wei W., Xu C., Wu L., Wang J., Ren J., Qu X., Scientific Reports 4 (2014) 3564.

[28] “**Hydrothermal synthesis of two photoluminescent nitrogen-doped graphene quantum dots emitted green and khaki luminescence”** Zhu X., Zuo X., Hu R., Xiao X., Liang Y., Nan J., Materials Chemistry and Physics 147 (2014) 963-967.

[29] **“Nitrogen-doped carbon quantum dots: Facile synthesis and application as a “turn-off” fluorescent probe for detection of Hg2+ ions”** Zhang R., Chen W., Biosensors and Bioelectronics 55 (2014) 83-90

[30] **“Synthesis and drug detection performance of nitrogen-doped carbon dots”** Niu J., Gao H., Journal of luminescence 149 (2014) 159-162.

[31] **“New strategy for synthesis and functionalization of carbon nanoparticles”** Jiang H., Chen F., Lagally M.G., Denes F.S., Langmuir 26 (2010) 1991-1995.

[32] **“Polyamine-functionalized carbon quantum dots for chemical sensing”** Dong Y.Q., Wang R.X., Li H., Shao J.W., Chi Y.W., Lin X.M., et al., Carbon 50 (2012) 2810-2815.

[33] **“Simple aqueous solution route to luminescent carbogenic dots from carbohydrates”** Peng H., Travas-Sejdic Journal of Materials Chemistry 21 (2009) 5563-5565.

[34] **“Carbon based dots co-doped with nitrogen and sulfur for high quantum yield and excitation-independent emission”** Dong Y., Pang H., Yang H.B., Guo C., Shao J., Chi Y., et al., Angewandte Chemie Internationl Edition in English 52 (2013) 7800-7804.

[35] **“Synthesis of nano onion-like fullerenes by chemical vapor deposition using an iron catalyst supported on sodium chloride”** Yang Y., Liu X., Guo X., Wen H., Xu B., Journal of nanoparticle Research 13 (2011) 1979.

[36] **“Irradiation effects in carbon nanostructures”** Banhart F., Reports on Progress in Physics 62 (1999) 1181.

[37] **“Properties of carbon onions produced by an arc discharge in water”** Sano N., Wang H., Alexandrou I., Chhowalla M., Teo K.B.K., Amaratunga G.A.J., et al., Journal of Applied Physics 92 (2002) 2783–2788.

[38] **“Curling and closure of graphitic networks under electron-beam irradiation”** Ugarte D., Nature 359 (1992) 707–9.

[39] **“The formation, annealing and self-compression of carbon onions under electron irradiation”** Banhart F., Fuller T., Redlich P., Ajayan P.M., Chemical Physics Letters 269 (1997) 349–55.

[40] **“Controlled synthesis, efficient purification, and electrochemical characterization of arc-discharge carbon nano-onions”** Borgohain R., Yang J., Selegue J.P., Kim D.Y., Carbon 66 (2014) 272–284.

[41] **“Facile chemical deoxygenation of micellar solutions for room temperature phosphorescence”** M.E. Díaz-García, A. Sanz-Medel, Anal. Chem. 58 (1986) 1436-1440.

[42] **“Study of the heavy atom-induced room temperature phosphorescence properties of melatonin and its analytical application”** M. Amjadi et al., Spectrochimica Acta Part A 63 (2006) 337–342.

[43] **“Interaction of drugs with bovine and human serum albumin”** Sulkowska A., Journal of Molecular Structure 614 (2002) 227–232.

[44] **“Intramolecular Engergy Transfer in Europium Chelates Du to Excitation of the Triplet State”** Y. Matsuda, S. Makishima and S. Shinoya, Bulletin of the Chemical Society of Japan, 41 (1968) 1513-1518.

[45] **“Quenching of Excited States by Lanthanide Ions and Chelates in Solution”** G. E. Buono-Core, H. Li and B. Marciniak, Coordination Chemistry Reviews, 99 (1990) 55-87.

[46] **“Selective room temperature phosphorescence detection of heparin based on manganese-doped zinc sulfide quantum dots/polybrene self-assembled nanosensor”** Biosensors and Bioelectronics 68 (2015) 556–562.

[47] **“Química analítica de los cationes: Mercurio”** Burriel Martí F., Lucena Conde F., Arribas Jimeno S., Hernández Méndez J., Química analítica cualitativa (2006) Thomson 435–450.

[48] **“Development of a selective and pH-independent method for the analysis of ultratrace amounts of nitrite in environmental water samples after dispersive magnetic solid phase extraction by spectrofluorimetry”** Tarigh G. D., Shemirani F., Talanta 128 (2014) 354–359.

[49] **“Indirect cloud point extraction and spectrophotometric determination of nitrite in water and meat products”** Pourreza N., Fat'hi M. R., Hatami A., Microchemical Journal 104 (2012) 22–25.

[50] Agencia federal para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades, **Departamento de Servicios de Salud (California).**