

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

**MASTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA
ALIMENTARIA**

**“DETERMINACIÓN DE ANIONES EN
AGUAS DE CONSUMO EMPLEANDO
NANOPARTÍCULAS FLUORESCENTES”**

**PROYECTO FIN DE MASTER
POR**

JORGE ESPINA CASADO

JULIO, 2012





Master en Biotecnología Alimentaria
Universidad de Oviedo
C/Julián Clavería s/n. 33071 Oviedo. España
Tel. 985106226. Fax 985103434. <http://www.unioviado.es/MBTA>



PROFESOR TUTOR:

Dra. Marta Elena Díaz-García (Universidad de Oviedo)

CERTIFICA:

Que D. **Jorge Espina Casado** ha realizado bajo mi dirección el Proyecto de Investigación al que corresponde la presente memoria en el contexto de los estudios del Máster Universitario en Biotecnología Alimentaria, promoción 2011-2012.

Oviedo, de 23 de Julio 2012

D.^a Marta Elena Díaz García

V^oB^o

Mario Díaz Fernández

Coordinador del Máster en Biotecnología Alimentaria

AGRADECIMIENTOS:

A la Dra. Marta Elena Díaz García por su interés, apoyo y conocimientos que me han ayudado a poder realizar este proyecto. Además agradecerle el haberme permitido formarme en su equipo de investigación.

A los Doctores Rosana Badía Laño y Alfonso Fernández González por sus apoyos, conocimientos y ayuda para la realización de este proyecto.

A los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Oviedo.

A mis compañeros de Laboratorio Alejandro, Asia, Marian y Tere por echarme una mano siempre que lo he necesitado y por el buen ambiente que hay en el laboratorio.

A mis compañeros de máster por hacer más llevaderas las largas sesiones de clases y prácticas y por la ayuda que me han brindado a lo largo del curso.

Al “consejo de sabios” por su apoyo y por estar siempre ahí cuando se les necesite sin pedir nada a cambio. Sin vosotros no podría haber llegado hasta aquí.

Por último agradecer a mis padres todo lo que han hecho por mi, y haberme apoyado siempre en las decisiones que he tomado aunque me haya equivocado. Además de ser ejemplo de cómo hay que hacer las cosas en la vida. A mi hermana y a Javier por haberme ayudado espero algún día poder corresponderos.

INDICE

Resumen	A
ABSTRACT	B
LISTA DE FIGURAS	C
Lista de tablas	F
Lista de esquemas.	G
1. Introducción.....	1
1.1. ¿Por qué usar nano?	2
1.2. Clasificación de los nanomateriales.	2
1.3. Aplicaciones de la nanotecnología.....	3
2. Consideraciones teóricas y experimentales	7
2.1. Nanopartículas fluorescentes.	7
2.1.1. Niveles electrónicos.	7
2.1.2. Quantum dots	9
2.1.3. Nanopartículas de óxidos inorgánicos	11
2.1.4. Nanopartículas metálicas	11
2.1.5. Nanopartículas de carbono: Carbon-Dots.....	14
2.2. Objetivos del presente trabajo.....	15
3. Parte experimental	19
3.1. Reactivos y disoluciones	19
3.2. Instrumentacion analítica	19
3.3. Utillaje de laboratorio	20
3.4. Síntesis de carbon dots	20
3.5. Síntesis de nanoclusters de oro modificados con glutation.	20
3.6. Preparación de nanopartículas de ZrO ₂ inmovilizadas en películas de gel.....	21
4. Resultados y discusión.....	22

4.1.	Nanopartículas de ZrO ₂	22
4.1.1.	Caracterización de las nanopartículas de ZrO ₂	22
4.1.2.	Ensayos en disolución.....	23
4.1.3.	Ensayos con nanopartículas de ZrO ₂ inmovilizadas en soportes sol-gel..	25
4.2.	Carbon-dots	28
4.2.1.	Caracterización de los carbón-dots por fluorescencia.	28
4.2.2.	Interacción de los carbón-dots con las especies de fósforo.	29
4.3.	Clusters de oro modificados con glutatión (GSH).	31
4.3.1.	Caracterización de los clusters.....	31
4.3.2.	Interacción de los clusters Au-GSH modificados con iones Fe(III).	33
4.3.3.	Interacción de los clusters Au-GSH-Fe(III) con iones HPO ₄ ⁼	33
4.3.4.	Interacción de los clusters Au-GSH modificados con iones Al(III).	37
4.3.5.	Experiencias preliminares sobre la interacción de los clusters Au-GSH-Al(III) con iones HPO ₄ ⁼	38
5.	Conclusiones	41
6.	Sugerencias para estudios posteriores	42
7.	Bibliografía	43
8.	Anexo 1.....	47
8.1.	Fluorescencia.	47

Resumen

Aunque los fosfatos no son tóxicos para personas ni animales, es importante su determinación para comprobar no sólo la calidad de las aguas (indicador de la contaminación orgánica) sino también para el control del adecuado funcionamiento de los procesos de depuración de aguas. Los métodos de análisis convencionales para la determinación de fosfatos en aguas adolecen de sensibilidad y selectividad. En este trabajo hemos abordado la búsqueda de nuevos métodos analíticos para especies de fósforo basados en el empleo de nanomateriales. En particular, las nanopartículas metálicas y de óxidos metálicos, dadas sus propiedades ópticas únicas, son sistemas potencialmente adecuados para desarrollar nuevos métodos de reconocimiento de especies de fósforo. En este proyecto se ha evaluado, empleando medidas fluorimétricas, la interacción de aniones PO_4^{3-} , HPO_4^- y H_2PO_4^- con varios tipos de nanopartículas (carbon-dots, nanopartículas de ZrO_2 y clusters Au-GSH). Los resultados mostraron que el sistema Au-GSH es el que mayor potencial analítico ofreció para la determinación de HPO_4^- en muestras reales.

ABSTRACT

Although phosphorous is non-toxic to humans and animals, its monitoring is key not only to control water quality (organic pollution indicator) but also to control the proper operation of water treatment stations. Conventional analytical methods for phosphates in waters lack sensibility and selectivity. In the present work, we have addressed the search for new analytical approaches for phosphorous species based on the use of nanomaterials. Particularly, metallic and metal oxide nanoparticles, due to their unique optical properties, offer a huge potential to develop new methods for phosphorous species recognition. In this project, we have assessed, using fluorescence measurements, the interaction between PO_4^{3-} , HPO_4^{2-} and H_2PO_4^- different kind of nanoparticles (carbon-dots, ZrO_2 nanoparticles and Au-GSH clusters). Results demonstrated that the system based on Au-GSH clusters offered promising analytical potential for HPO_4^{2-} determination in real samples.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Escala manométrica.	1
Figura 2: Representación de los diferentes tipos de nanomateriales	3
Figura 3 Ejemplo de nanotrazadores: nanopartícula que actúa <i>per sede</i> trazador y nanopartículas funcionalizadas.	4
Figura 4 Representación de un sensor bioquímico	5
Figura 5 Recuperación medioambiental empleando nanopartículas de TiO_2	6
Figura 6 Evolución de los niveles electrónicos en función del tamaño de la partícula. ...	7
Figura 7 Número de átomos superficiales respecto a los del volumen total en función del tamaño. En el recuadro, la expresión matemática para el cálculo del número de átomos en superficie (N) en función del número de capa (n). a) Celdilla unidad FCC; b) Celdilla FCC vista desde un vértice.....	8
Figura 8 Esquema comparativo de niveles electrónicos en una molécula, un semiconductor convencional y un nanocrystal semiconductor	9
Figura 9 Espectros de absorción y fluorescencia de quantum dots basados en CdSe, donde se muestra el efecto de confinamiento cuántico debido al tamaño y la modulación de la emisión fluorescente. Adaptado de referencia [8].	10
Figura 10 Las propiedades nanoscópicas de las nanopartículas dependen de diversos factores (adaptado de Ref. 12).	12
Figura 11 Plasmón superficial. k: vector de ondas, E: campo eléctrico, H: campo magnético.....	13
Figura 12 Nanopartícula en situación de no equilibrio al aplicar un campo electromagnético externo E_{ext} : se produce un desplazamiento de cargas electrónicas que se acumulan en la superficie de la partícula y producen un campo electromagnético que tiende a restaurar el equilibrio E_{rest}	13
Figura 13 Fotoluminiscencia en carbón-dots pasivados.	14
Figura 14 Ciclo del fósforo. Adaptado de Referencia [18]	16
Figura 15 Imagen TEM de nanopartículas de ZrO_2	23

Figura 16 Espectros de emisión de suspensiones de nanopartículas de ZrO_2 en presencia de iones HPO_4^-	24
Figura 17 Accesorio del fluorímetro de tiempo resuelto Edimburgh Instruments FLS920 Series para la disposición de películas.....	25
Figura 18 Intensidad de fluorescencia de películas con cantidades crecientes de ZrO_2 . 26	
Figura 19 Espectros de fluorescencia de láminas preparadas por spin-coating y recubrimiento homogéneo. Porcentaje de nanopartículas: 1% ZrO_2	27
Figura 20 Intensidad de fluorescencia de láminas homogéneas de nanopartículas de ZrO_2 tras su interacción con iones HPO_4^-	28
Figura 21 Espectros de emisión de carbón-dots a diferentes pHs.	28
Figura 22 Diagrama de estabilidad de las diferentes especies derivadas del ácido fosfórico en función del pH. Adaptada de referencia [31].	29
Figura 23 Desactivación de la fluorescencia de los carbón-dots en función de la concentración de $H_2PO_4^-$	30
Figura 24 Desactivación de la fluorescencia de los carbón-dots en función de la concentración de HPO_4^-	30
Figura 25 Intensidad de fluorescencia de carbón-dots en función de la concentración de ión PO_4^{3-}	31
Figura 26 Espectro de emisión de clusters Au-GSH. $\lambda_{exc}= 396$ nm.	32
Figura 27 Imágenes HR-TEM de clusters Au-GSH	32
Figura 28 Espectros de emisión de fluorescencia de los clusters Au-GSH en presencia y ausencia de iones Fe(III).	33
Figura 29 Espectros de emisión de los clusters de Au-GSH en presencia de Fe(III) y adiciones sucesivas de aniones HPO_4^-	34
Figura 30 Intensidad de emisión de los clusters Au-GSH-Fe(III) en presencia de cantidades crecientes de HPO_4^- a diferentes longitudes de onda de emisión. $\lambda_{exc} = 396$ nm.	35
Figura 31 Espectros de emisión de fluorescencia de los clusters Au-GSH en presencia y ausencia de iones Al(III).	37

Figura 32 Intensidad de emisión de los clusters Au-GSH-Al(III) en presencia de cantidades crecientes de $\text{HPO}_4^{=}$ a 600 nm siendo $\lambda_{\text{exc}} = 396$ nm.	38
Figura 33 Intensidad de emisión de los clusters Au-GSH-Al(III) en presencia de cantidades crecientes de $\text{HPO}_4^{=}$ a $\lambda_{\text{emi}} = 600$ nm y $\lambda_{\text{exc}} = 396$ nm.....	39
Figura 34 Mecanismo de interacción entre los clusters Au-GSH con el Al(III) y la posterior adición de $\text{HPO}_4^{=}$ y su efecto en la fluorescencia del sistema.....	40

Lista de tablas

Tabla 1 Composición de las disoluciones de nanopartículas de ZrO_2 y $\text{HPO}_4^{=}$	24
Tabla 2 Resumen de las ecuaciones de cada línea de calibrado en su respectiva longitud de onda así como su coeficiente de correlación lineal (R^2) y el intervalo de concentraciones aplicable.	36

Lista de esquemas.

Esquema 1 Plan general de trabajo	18
Esquema 2 Mecanismo de interacción entre los clusters Au-GSH con el Fe(III) y la posterior adición de HPO_4^- y su efecto en la fluorescencia del sistema.....	36

1. Introducción

La palabra nanotecnología es usada para definir las ciencias y técnicas aplicadas a un nivel de nano escala; esto es, desde 10 nm (10^{-9} m) hasta 100 nm. En síntesis, es la tecnología que ofrece la posibilidad de fabricar materiales y máquinas a partir del reordenamiento de átomos y moléculas.

La nanotecnología es el estudio, diseño, creación, síntesis, manipulación y aplicación de materiales, aparatos y sistemas funcionales a través del control de materia a escala nanométrica. La nanotecnología abarca la producción y aplicación de sistemas químicos, físicos y biológicos en la escala comprendida entre átomos individuales o moléculas hasta dimensiones de micrómetros, además de su integración en sistemas mayores (Figura 1). Al ser sistemas a una escala tan pequeña, la síntesis y manipulación de estos sistemas presenta uno de los mayores retos en investigación.

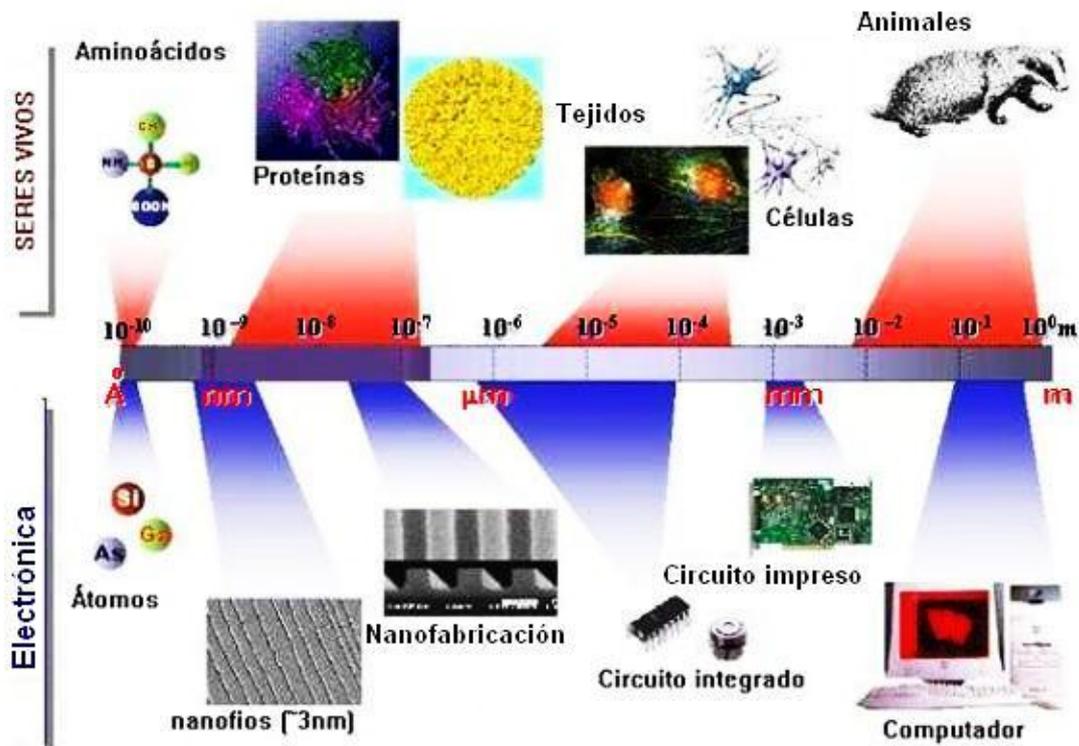


Figura 1: Escala manométrica.

El 29 de diciembre de 1959, el galardonado con el premio Nobel, Richard P. Feynman, en el Congreso Anual de la Sociedad Americana de Física (Caltech, 1959), incluyó su

Determinación de aniones en aguas de consumo empleando nanopartículas fluorescentes

ya famosa frase: *“There’s plenty of room at the bottom”* en la presentación de una nueva visión tecnológica sobre la miniaturización extrema, bastantes años antes de que la palabra “chip” llegara a ser parte de nuestro léxico. Feynman imaginaba una tecnología capaz de construir nano objetos átomo a átomo o molécula a molécula. Desde 1980 muchos descubrimientos han llegado gracias al testamento de su visión.

1.1. ¿Por qué usar nano?

La nanociencia y la nanotecnología son importantes porque tienen el potencial para resolver muchos de los problemas de la humanidad. Algunos expertos consideran que su impacto sobre nuestra vida será tan importante como en su día fue el impacto de la medicina o el impacto de los ordenadores. Con ayuda de la nanotecnología, se espera encontrar varias aplicaciones únicas:

- ✚ Fabricar nuevos materiales como ropa que cambia de color, nuevos adhesivos, nuevos materiales para la construcción que se autolimpian, robots con capacidad de "ver" y "sentir"....
- ✚ Nuevas tecnologías de la información, tales como la computación cuántica y microchips capaces de almacenar trillones de bytes de información en un aparato tan pequeño como la punta de un alfiler.
- ✚ Avances médicos, incluyendo la administración de medicinas y la detección y tratamiento de enfermedades como el cáncer. Con la nanotecnología se podrá construir pequeñas "naves sanguíneas" que transportan medicinas directamente a un tumor cancerígeno para destruirlo.
- ✚ Beneficios para el medioambiente como la purificación de agua, sistemas para controlar la contaminación, nuevas fuentes de energía sostenible y limpia etc.

1.2. Clasificación de los nanomateriales.

Los nanomateriales pueden clasificarse según las dimensiones espaciales que superen el intervalo de valores de la nanoescala; es decir, dependiendo de cuantas dimensiones superen dichas dimensiones tendremos un tipo u otro [1]. Según este criterio podemos clasificarlos de la siguiente forma (Figura 2):

Determinación de aniones en aguas de consumo empleando nanopartículas fluorescentes

- ✚ Nanomateriales 0D: Ninguna de las dimensiones espaciales supera el rango de valores de la nanoescala (p.e. puntos cuánticos, nanopartículas esféricas de oro).
- ✚ Nanomateriales 1D: Una de las dimensiones espaciales supera el rango de valores de la nanoescala. Este tipo de nanomaterial se denomina nanohilos.
- ✚ Nanomateriales 2D: Dos de las dimensiones espaciales supera el rango de valores de la nanoescala. A esta clasificación corresponde las películas delgadas.
- ✚ Nanomateriales 3D: Aunque no deberían considerarse nanomateriales ya que todas las dimensiones espaciales superan los 100 nm, se denomina nanomateriales 3D a aquellos que se replican de forma ordenada en las 3 direcciones del espacio y cuyas unidades corresponden a alguno de los anteriores nanomateriales.

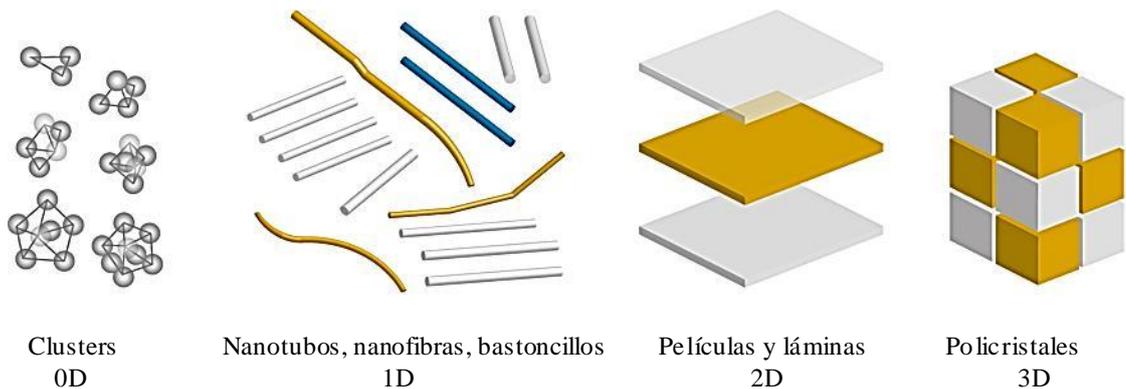


Figura 2: Representación de los diferentes tipos de nanomateriales

1.3. Aplicaciones de la nanotecnología.

La nanotecnología es usada en muy diversas aplicaciones en muchos ámbitos de la industria. La combinación de la existencia de muchos tipos de nanopartículas como pueden ser nanopartículas de SiO₂, ZrO₂, Au, Ag, ZnO, nanotubos de carbono, etc, las diferentes formas en las que podemos encontrarlas: esferas, hilos, tubos, etc. con las especiales propiedades físicas y/o químicas que exhibe la materia al nivel de la nanoescala, ofrece muchas oportunidades en diferentes campos.

Determinación de aniones en aguas de consumo empleando nanopartículas fluorescentes

Así, por ejemplo, se han desarrollado nanopartículas que actúan como materiales de reconocimiento (nanotrazadores, nanosensores) para la determinación de pesticidas, nutrientes, biomarcadores oncológicos, etc :

- ✚ Nanotrazadores como marcadores para (bio)sensores: Las nanotrazadores son nanopartículas que poseen propiedades ópticas intrínsecas y pueden funcionar ellas mismas como trazador a un cambio físico bien, pueden estar funcionalizadas con un compuesto que actúa como zona de reconocimiento (Figura 3).

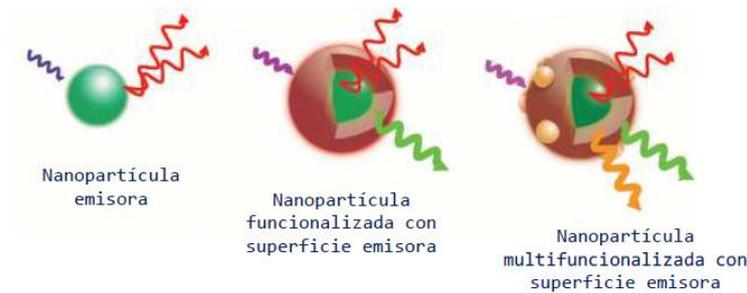


Figura 3 Ejemplo de nanotrazadores: nanopartícula que actúa *per se* trazador y nanopartículas funcionalizadas.

Estos nanotrazadores constituyen la base de diversos métodos de análisis, siendo un ejemplo representativo el marcaje de moléculas biológicas con dichas nanopartículas para su empleo en el desarrollo de biosensores. Un biosensor es un dispositivo analítico (Figura 4) en el que una molécula biológica (marcada o no marcada) inmovilizada en un soporte adecuado, reconoce de forma específica a un analito (marcado o no marcado), generando un cambio físico-químico que es detectado por el marcador y transformado en una señal analítica (óptica, electroquímica, piezoeléctrica, etc) [2].

Determinación de aniones en aguas de consumo empleando nanopartículas fluorescentes

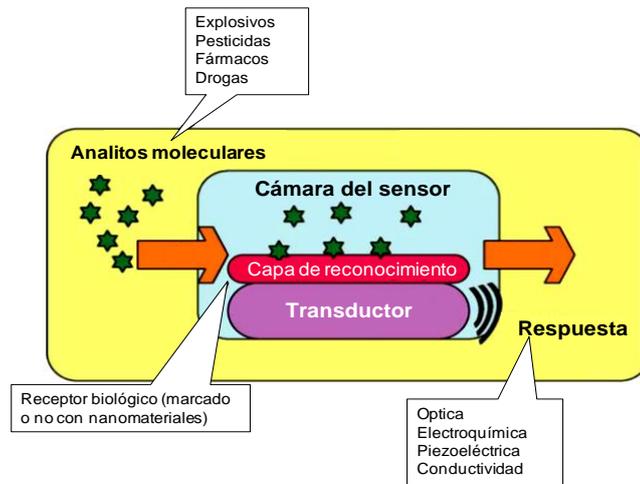


Figura 4 Representación de un sensor bioquímico

- ✚ Nanotecnología para preservar alimentos: desarrollo de nuevos nanocomposites, (polímeros conteniendo nanopartículas dispersadas) [3]. Se usan, por ejemplo, en envases de cervezas que los hacen más resistentes al intercambio de gases, con una menor pérdida de CO₂, en recubrimientos comestibles con un espesor de 5nm en quesos, frutas, vegetales, carnes, panes y comida rápida. Estos recubrimientos actúan de barrera a los gases. Se están desarrollando envases para ketchup y mayonesa que impiden que queden restos del producto adheridos al interior.
- ✚ Acción antibacteriana [4]: El uso de nanopartículas de plata como agente antibacteriano está muy extendido. Nanocomposites con nanopartículas de plata se usan por ejemplo en neveras para la eliminación de olores y en envases de alimentos para prolongar la vida útil de los mismos.
- ✚ Nanotecnología en la agricultura [5]: empleo de nanopartículas en la agricultura para tratamiento de suelos y en cultivos. Por ejemplo, nanopartículas de TiO₂, ZnO₂ se han utilizado para eliminar contaminantes (xenobióticos) del suelo, por adsorción del mismo sobre la nanopartícula. La acción de la radiación UV sobre el agente xenobiótico adsorbido favorece su descomposición en CO₂ y O₂ (Figura 5).

Determinación de aniones en aguas de consumo empleando nanopartículas fluorescentes



Figura 5 Recuperación medioambiental empleando nanopartículas de TiO₂

En otros campos también tienen importantes aplicaciones los nanomateriales y los dispositivos de ellos derivados, como son los siguientes:

- Almacenamiento, producción y conversión de energía.
- Armamento y sistemas de defensa.
- Producción agrícola.
- Tratamiento y remediación de aguas.
- Diagnóstico y seguimiento de enfermedades.
- Sistemas de administración de fármacos.
- Procesamiento de alimentos.
- Remediación de la contaminación atmosférica.
- Construcción.
- Monitorización de la salud.
- Detección y control de plagas.
- Control de desnutrición en lugares pobres.
- Informática.
- Alimentos transgénicos.
- Cambios térmicos moleculares (Nanotermología)

2. Consideraciones teóricas y experimentales

2.1. Nanopartículas fluorescentes.

La emisión de fluorescencia para una molécula que ha sido excitada radiacionalmente, se define como la emisión de radiación desde el nivel vibracional más bajo del primer estado excitado singlete a un nivel vibracional del estado fundamental (ver Anexo I para mayor detalle). En el caso de nanopartículas fluorescentes, la definición no se ajusta exactamente a la anterior debido a que en dichas nanopartículas no existen estados moleculares como en una molécula. Además, dependiendo del tipo de nanopartícula, la emisión de fluorescencia ocurrirá por unos fenómenos u otros que se detallarán más adelante.

2.1.1. Niveles electrónicos.

La materia a nivel de la nanoescala presenta unas propiedades químico-físicas únicas, diferentes a las de la materia a escala macroscópica [6]. El origen de estas propiedades, sorprendentes y, a veces, inesperadas, es doble: a) la reducción en tamaño, que produce cambios en los niveles electrónicos de los materiales y b) el incremento de los átomos de superficie respecto a los de volumen. Para clarificar estos aspectos, podemos tomar como modelo los niveles electrónicos de una partícula metálica.

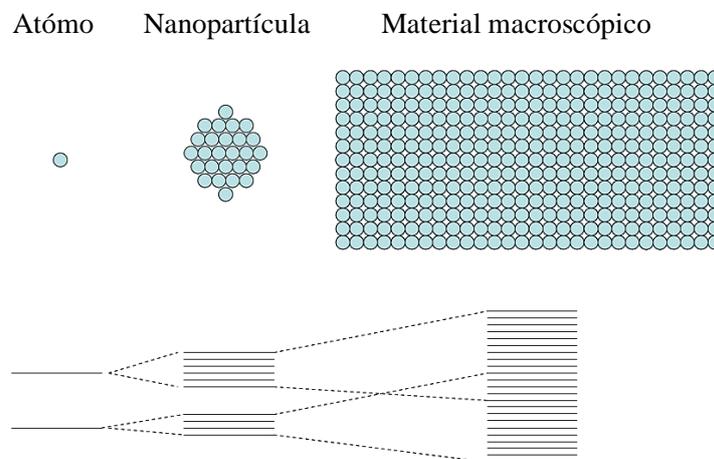


Figura 6 Evolución de los niveles electrónicos en función del tamaño de la partícula.

Determinación de aniones en aguas de consumo empleando nanopartículas fluorescentes

La distancia entre los estados de energía contiguos aumenta de forma inversa a como lo hace el volumen de las partículas, con lo que el espectro continuo de bandas que refleja la situación del material macroscópicamente, cambia hacia un conjunto de estados discretos al disminuir el tamaño hasta llegar a la escala nanométrica, como se ilustra en la Figura 6. El espaciado entre estados adyacentes en unidades de energía, es proporcional a la inversa de la raíz cúbica de las dimensiones de la partícula. Como consecuencia de que la distribución de niveles electrónicos sea discreta en las nanopartículas se producen profundas modificaciones en aquellas propiedades físicas que dependen de los electrones, como son las propiedades ópticas, magnéticas o de conducción.

Otra característica importante de las nanopartículas es el elevado número de átomos superficiales [6]. La figura 7 muestra la fracción de átomos de superficie respecto a los átomos de todo el volumen en función del tamaño de la partícula. Se ha tomado como modelo una nanopartícula con estructura cúbica centrada en las caras (FCC). Cuando el tamaño de las partículas disminuye, la fracción de átomos superficiales crece exponencialmente: en partículas nanométricas los efectos de superficie adquieren mucha importancia.

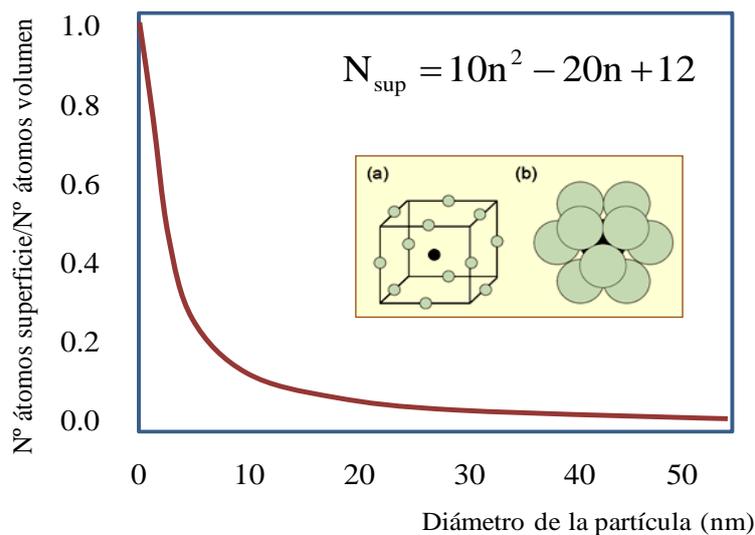


Figura 7 Número de átomos superficiales respecto a los del volumen total en función del tamaño. En el recuadro, la expresión matemática para el cálculo del número de átomos en superficie (N) en función del número de capa (n). a) Celdilla unidad FCC; b) Celdilla FCC vista desde un vértice.

Determinación de aniones en aguas de consumo empleando nanopartículas fluorescentes

2.1.2. Quantum dots

Los quantum dots son nanomateriales basados en semiconductores inorgánicos. En este grupo de nanopartículas el tamaño nano es muy importante, manifestándose el confinamiento cuántico, el confinamiento de electrones, en un espacio bien definido [7].

Los niveles de energía de una partícula macroscópica de un semiconductor vienen definida por 2 bandas, una llamada de valencia donde se encuentran los electrones y otra llamada de conducción. La diferencia de energía entre estas dos bandas se conoce como “gap” (banda prohibida) (Figura 8). Como comentamos con anterioridad, al disminuir el tamaño de la partícula los estados electrónicos se hacen cada vez más discretos. Esto afecta a las bandas de valencia y conducción las cuales se vuelven cada vez más estrechas y el “gap” entre ellas aumenta de energía, se produce el confinamiento cuántico.

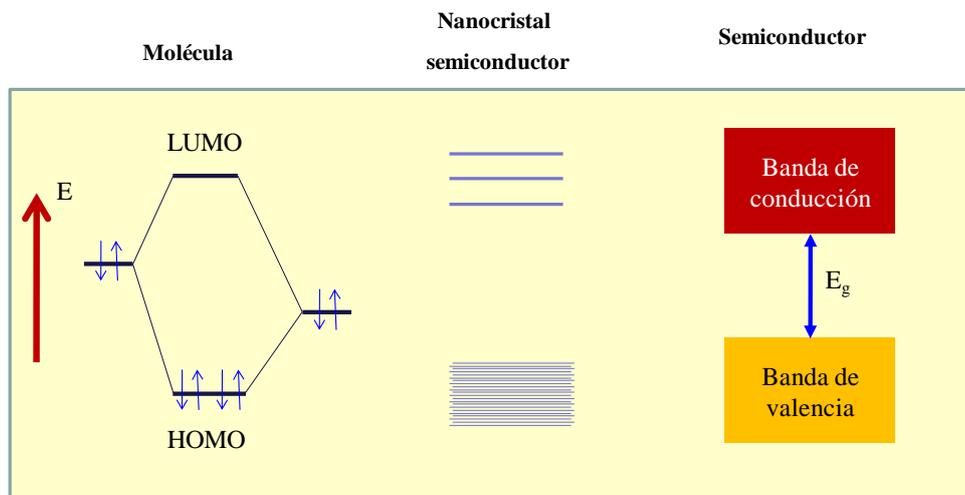


Figura 8 Esquema comparativo de niveles electrónicos en una molécula, un semiconductor convencional y un nanocrystal semiconductor

Dado que el tamaño de la partícula es el responsable de la modificación de la energía del “gap”, controlando el tamaño de los quantum dots es posible modificar sus propiedades físicas, en particular la fotoluminiscencia, lo que permite disponer de quantum dots con diferentes longitudes de onda de excitación ($\lambda_{excitación}$, λ es la longitud de onda) y de $\lambda_{emisión}$ de fluorescencia (ver Anexo I).

Determinación de aniones en aguas de consumo empleando nanopartículas fluorescentes

Con la absorción de un fotón de energía superior a E_{gap} la excitación de un electrón deja un hueco en la banda de valencia. En el estado más bajo de energía constituyen un par electrón-hueco electrostáticamente unidos, conocido como excitón. La relajación de electrón excitado a la banda de valencia destruye el excitón y este proceso puede ir acompañado por la emisión de un fotón, proceso que se conoce como recombinación radiativa. El excitón tiene un tamaño finito en el cristal y viene definido por el diámetro excitón de Bohr, que puede variar desde 1 nm a más de 100 nm, dependiendo del material (Figura 9) [8].

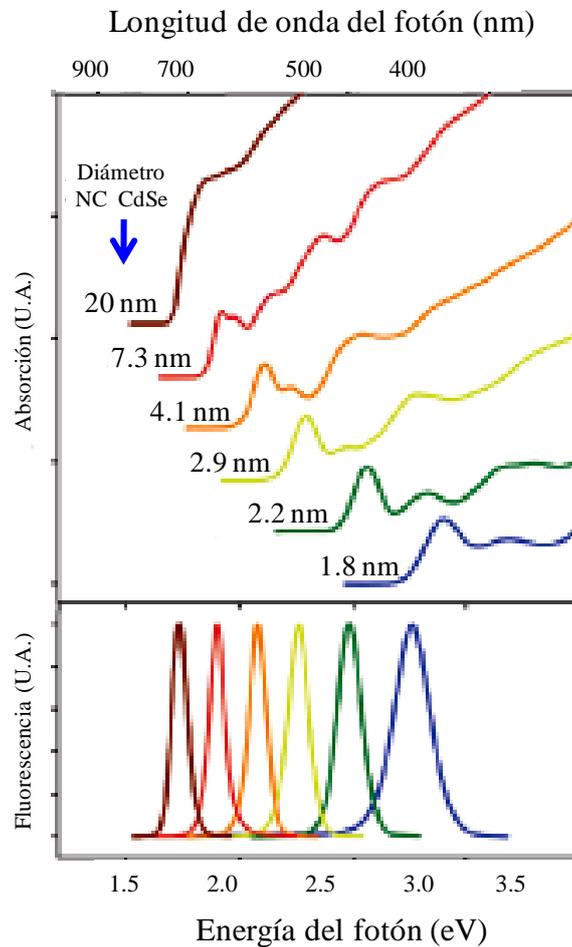


Figura 9 Espectros de absorción y fluorescencia de quantum dots basados en CdSe, donde se muestra el efecto de confinamiento cuántico debido al tamaño y la modulación de la emisión fluorescente. Adaptado de referencia [8].

Determinación de aniones en aguas de consumo empleando nanopartículas fluorescentes

2.1.3. Nanopartículas de óxidos inorgánicos

Las nanopartículas de óxidos metálicos también exhiben propiedades físicas y químicas únicas debido a su tamaño y a la elevada densidad de aristas/ángulos. Una de las propiedades básicas que está influenciada por el tamaño en estas nanopartículas es la simetría de la celda unidad y los parámetros de la misma [9]. Así, mientras que los óxidos metálicos en estado macroscópico son sistemas estables y con estructuras cristalográficas bien definidas, en la nanoescala toman importancia las tensiones entre los átomos superficiales e interfaciales: los cambios en la estabilidad termodinámica asociada con el tamaño induce modificaciones en los parámetros de celda y/o estructurales [10]. Este tipo de cambios estructurales se ha observado, por ejemplo, en nanopartículas de Al_2O_3 , NiO , Fe_2O_3 , ZrO_2 y Y_2O_3 entre otros.

Además de estos efectos, el confinamiento cuántico en las nanopartículas de óxidos metálicos da lugar a que la diferencia entre la banda de valencia y la de conducción sea muy grande, por lo que la energía necesaria para excitar estas nanopartículas es muy elevada. Eso significa que la energía de excitación está en la región ultravioleta, siendo además, el rendimiento cuántico de fluorescencia relativamente bajo.

No obstante, este tipo de nanopartículas son medios muy adecuados para actuar como matriz de otros iones como los de tierras raras, los cuales, son excelentes emisores de radiación. En este caso, no se observa el efecto de confinamiento debido a que los electrones responsables de la emisión se encuentran localizados en los orbitales atómicos del ión activo.

2.1.4. Nanopartículas metálicas

Las nanopartículas formadas por metales puros (p.e. Au, Ag), tienen propiedades ópticas diferentes al metal base y al resto de nanopartículas hasta ahora descritas. La resonancia de los plasmones superficiales (surface plasmon resonance, SPR) es una de las propiedades ópticas más notables de las nanopartículas metálicas. El fenómeno de los plasmones superficiales fue descubierto por R. Ritchie en 1957 [11].

Este fenómeno se debe a una oscilación colectiva de los electrones en la superficie del nanomaterial cuando son excitados por una radiación. Esta oscilación es muy sensible a

Determinación de aniones en aguas de consumo empleando nanopartículas fluorescentes

los cambios en el nanoentorno de la partícula que pueden ser utilizados con fines analíticos (p.e. en chips de análisis de ADN). El plasmón superficial genera una banda de absorción en el espectro, debido a la resonancia de las oscilaciones, que puede variar desde el infrarrojo hasta la región ultravioleta, dependiendo no sólo del tamaño de las nanopartículas, sino también del índice de refracción del medio, de la forma de las nanopartículas, del recubrimiento superficial o del estado de agregación, entre otros factores [12] (Figura 9).

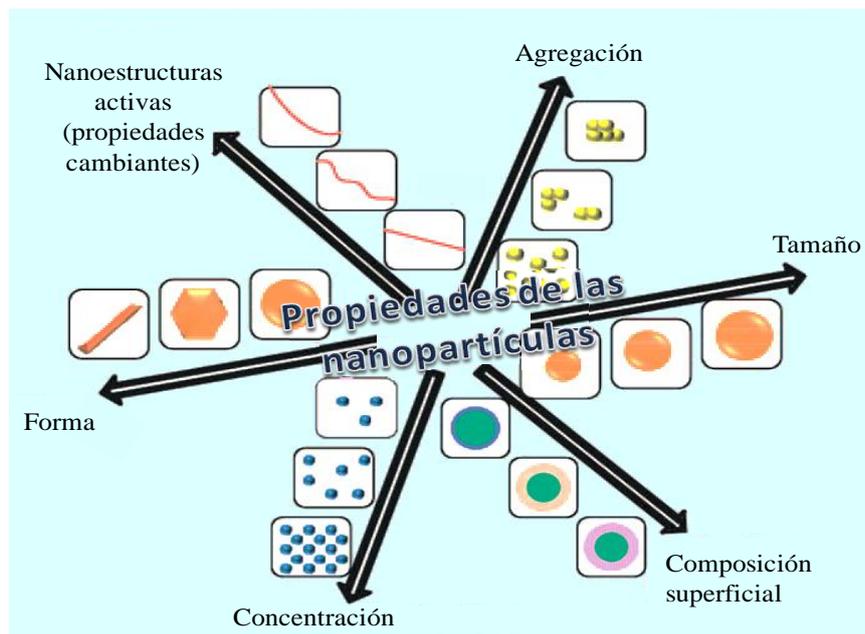


Figura 10 Las propiedades nanoscópicas de las nanopartículas dependen de diversos factores (adaptado de Ref. 12).

Una aproximación utilizada para el estudio de los plasmones se basa en el concepto de plasma: los electrones libres se tratan como un líquido de electrones de alta densidad (del orden de 10^{23} cm^{-3}), no teniendo en cuenta la red. En el caso de una superficie metálica, las oscilaciones del plasma se propagan a lo largo de sí misma, por lo que se denomina plasmón superficial. Estos plasmones de superficie no son radiativos y sus campos electromagnéticos decaen exponencialmente con la distancia perpendicular a la superficie [13]. Tiene su máximo en dicha superficie (Figura 10).

Determinación de aniones en aguas de consumo empleando nanopartículas fluorescentes

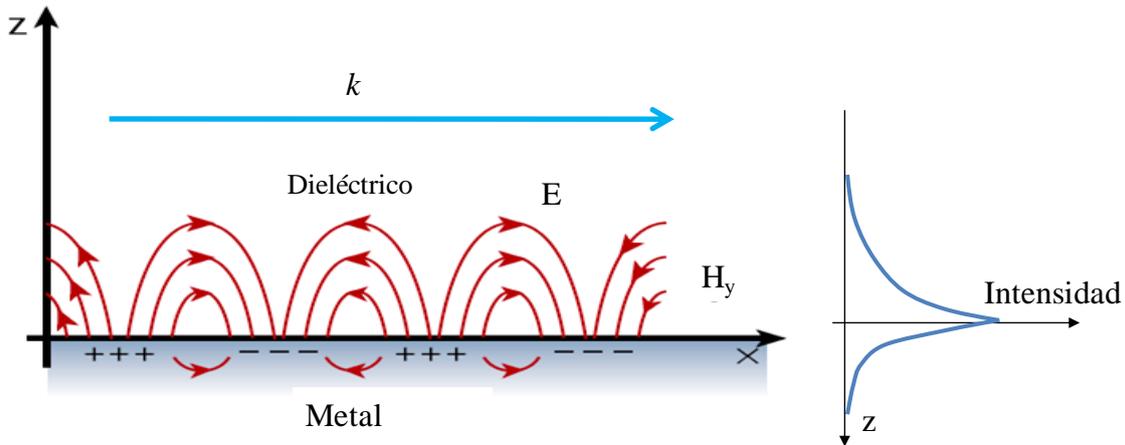


Figura 11 Plasmón superficial. k : vector de ondas, E : campo eléctrico, H : campo magnético

Cuando una radiación excita el plasmón superficial de una nanopartícula, se produce una acumulación de carga en la misma debida al movimiento de los electrones, que actúa como fuerza restauradora. El movimiento de los electrones está amortiguado por las interacciones con los núcleos atómicos y por la superficie de la nanopartícula.

Si se mantiene aplicado el campo electromagnético externo, el sistema se comporta como un oscilador amortiguado, caracterizado por una frecuencia de resonancia que, para la mayor parte de los metales de transición, cae en la región visible-ultravioleta del espectro (Figura 11).

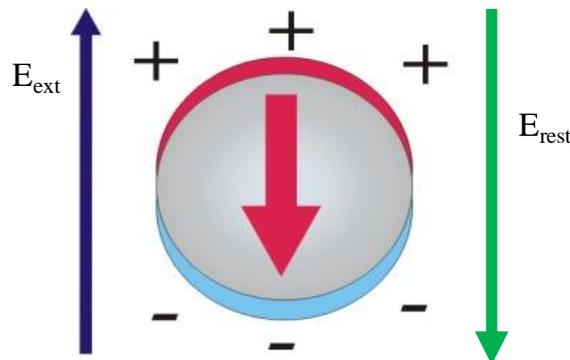


Figura 12 Nanopartícula en situación de no equilibrio al aplicar un campo electromagnético externo E_{ext} : se produce un desplazamiento de cargas electrónicas que se acumulan en la superficie de la partícula y producen un campo electromagnético que tiende a restaurar el equilibrio E_{rest} .

Determinación de aniones en aguas de consumo empleando nanopartículas fluorescentes

Cuando las nanopartículas son suficientemente pequeñas, el efecto de la superficie cobra mayor importancia: el recorrido libre medio de los electrones se ve modificado por los choques con las paredes de la partícula, lo que aumenta el amortiguamiento de las oscilaciones plasmónicas. Existen varias teorías que describen el comportamiento de los plasmones superficiales, entre ellas están la teoría de Mie y el modelo de Drude-Sommerfeld [13] y cuyo desarrollo cae fuera del objeto de este trabajo.

2.1.5. Nanopartículas de carbono: Carbon-Dots

El carbono tal y como lo conocemos es un material de color negro e insoluble en agua, al menos eso se creía hasta ahora. Con el descubrimiento de los carbon-dots el concepto ha cambiado. Los carbon-dots son nanopartículas de carbono que se dispersan fácilmente en agua y presentan una elevada fluorescencia. Al igual que ocurre con los puntos cuánticos basados en semiconductores, la frecuencia de emisión se puede modular, lo que ofrece un potencial elevado para el desarrollo de nuevas metodologías analíticas.

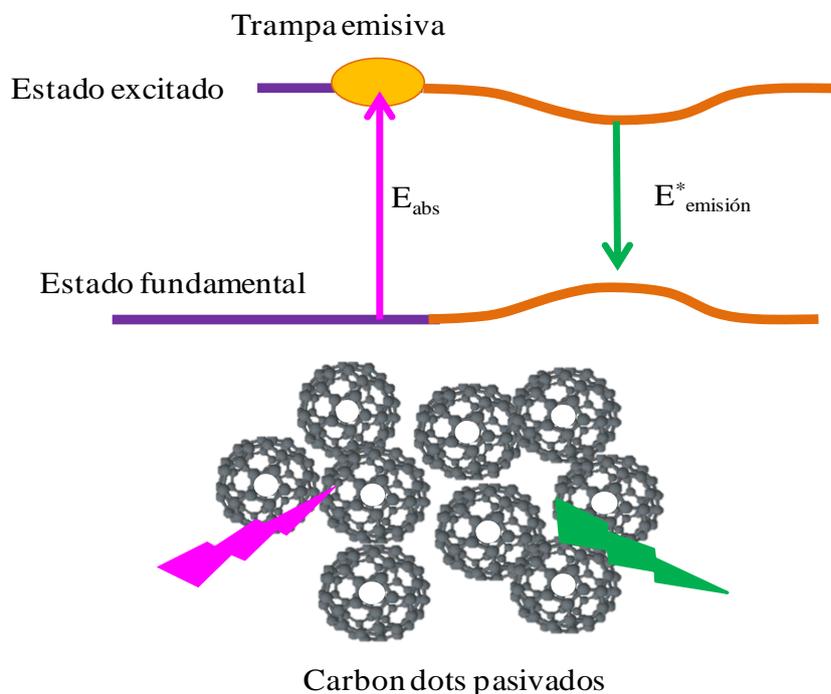


Figura 13 Fotoluminiscencia en carbón-dots pasivados.

Determinación de aniones en aguas de consumo empleando nanopartículas fluorescentes

Los carbon-dots son nanopartículas discretas de carbono con una geometría prácticamente esférica y con tamaños cercanos a los 10 nm. La fotoluminiscencia de los carbon-dots es muy estable y no experimenta variaciones tras varias horas de continua excitación. A diferencia de otras nanopartículas luminiscentes como los quantum dots, su fluorescencia no experimenta “centelleo”. Además, existe una clara dependencia entre la longitud de onda de excitación y la de emisión, así como de su intensidad [14]. Mecánicamente, la luminiscencia de los carbon-dots se atribuye a la presencia de trampas de energía superficiales que tras su pasivación se estabilizan y emiten radiación por recombinación de excitones (Figura 12). No obstante, además de esa pasivación es necesario el confinamiento cuántico de esas trampas de energía para que se produzca la fluorescencia. De hecho, se ha observado que carbón dots de diámetros que oscilan entre 30-50 nm, con el mismo tratamiento de pasivación superficial, son menos fluorescentes que los de 10 nm [15].

2.2. Objetivos del presente trabajo

Como hemos visto, las nanopartículas en general presentan propiedades ópticas únicas que ofrecen un extraordinario potencial analítico. Junto a estas características, es posible modificar químicamente su superficie (funcionalización con agentes químicos o biológicos) a través de enlaces de diferente naturaleza, lo que permite dirigir la interacción de esas nanopartículas con una determinada especie para su reconocimiento iónico o molecular y su determinación cuantitativa.

En el presente trabajo se ha planteado la posibilidad de emplear nanopartículas de diferente naturaleza (ZrO_2 , carbón dots, Au) para el reconocimiento y determinación de fosfatos en aguas de consumo, aguas de acuarios y aguas superficiales frescas.

Aunque el fósforo está ampliamente distribuido en suelos, aguas, seres vivos, no se presenta en forma elemental en la naturaleza. Por el contrario, el fósforo es muy reactivo y forma compuestos con oxígeno, aluminio y calcio, entre otros elementos. Así, el fósforo puede presentarse en aguas naturales y residuales bajo diferentes especies químicas: ortofosfatos, metafosfatos y pirofosfatos, siendo el ortofosfato la especie más importante. Todas las demás especies se convierten a ortofosfato por calentamiento. A

Determinación de aniones en aguas de consumo empleando nanopartículas fluorescentes

veces, también se pueden presentar (en menor concentración y menos frecuentemente) especies ligadas a restos orgánicos (fosfolípidos, cadenas peptídicas).

En la mayoría de las fuentes naturales de agua existen cantidades relativamente altas de iones calcio y magnesio y dado que los fosfatos de dichos elementos son altamente insolubles ($K_{PSCa_3(PO_4)_2} = 2.07 \times 10^{-29}$, $K_{PSMg_3(PO_4)_2} = 1.04 \times 10^{-24}$)[16], la concentración de ortofosfato en aguas naturales es relativamente baja (≤ 10 ppm).

El fósforo inorgánico en las aguas superficiales o en las aguas residuales proviene de diversas fuentes [17]:

- Fertilizantes eliminados del suelo por el viento o el agua
- Excreciones humanas y animales
- Detergentes y productos de limpieza
- Erosión del terreno

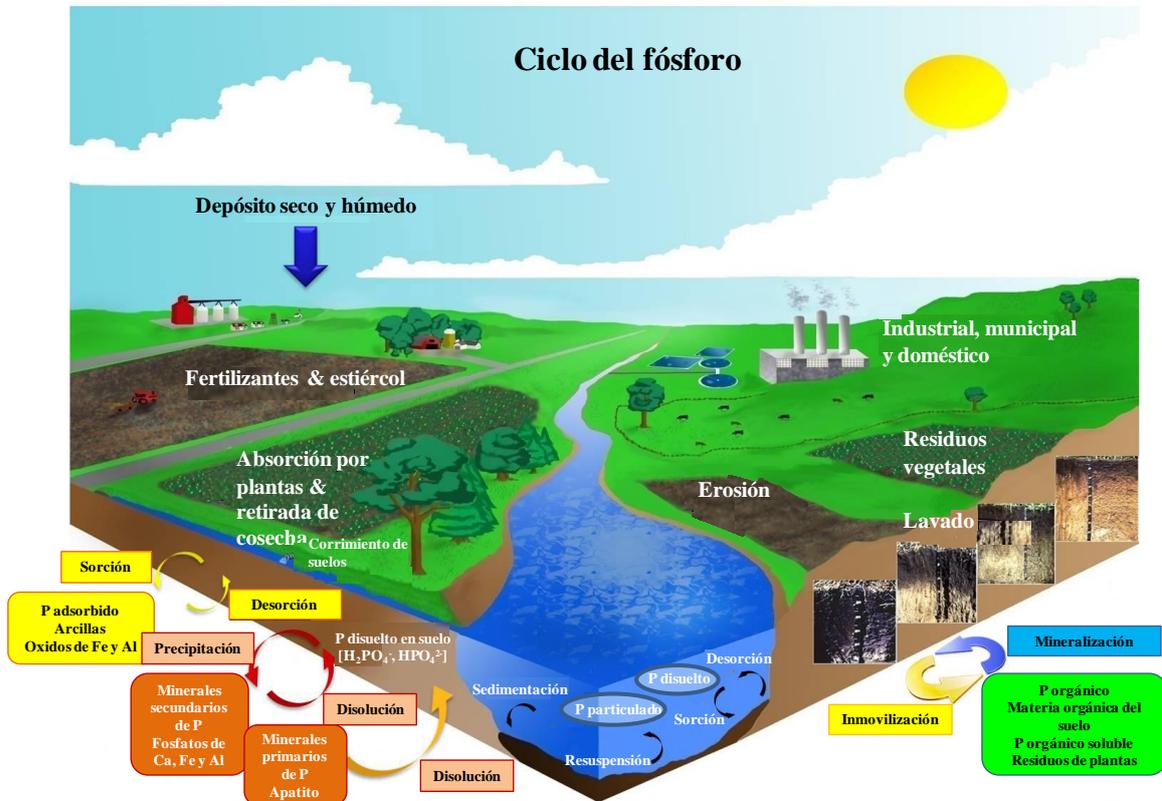


Figura 14 Ciclo del fósforo. Adaptado de Referencia [18]

Determinación de aniones en aguas de consumo empleando nanopartículas fluorescentes

El ciclo del fósforo es complejo. En la Figura 13 se muestran algunos de los principales procesos de ese ciclo [18]. Los compuestos del fósforo son nutrientes esenciales de las plantas. Dependiendo de la concentración de fosfato existente en el agua, puede estimularse el crecimiento de organismos fotosintéticos (p.e. algas) llegando a producirse la eutrofización de ríos y lagos. Cuando estas algas mueren, los procesos de descomposición dan como resultado una demanda de oxígeno elevada. Las concentraciones críticas para una eutrofización incipiente se encuentran entre 0,1-0,2 mg/l $\text{PO}_4\text{-P}$ en el agua corriente y entre 0,005-0,01 mg/l $\text{PO}_4\text{-P}$ en aguas tranquilas. Dado el peligro potencial para las aguas superficiales, la directiva de la Unión Europea [19] especifica unos valores límite para el vertido de compuestos de fósforo a las aguas receptoras. En función del tamaño de la E.D.A.R. (Estación Depuradora de Aguas Residuales), estos valores son 2 mg/l P total (10.000 – 100.000 h-e) o 1 mg/l P total (> 100.000 h-e). Estos valores están expresados en función del concepto habitante-equivalente (1 “habitante equivalente” corresponde a la carga orgánica biodegradable con una demanda bioquímica de oxígeno de cinco días (DBO 5), de 60 gramos de oxígeno por día) [19].

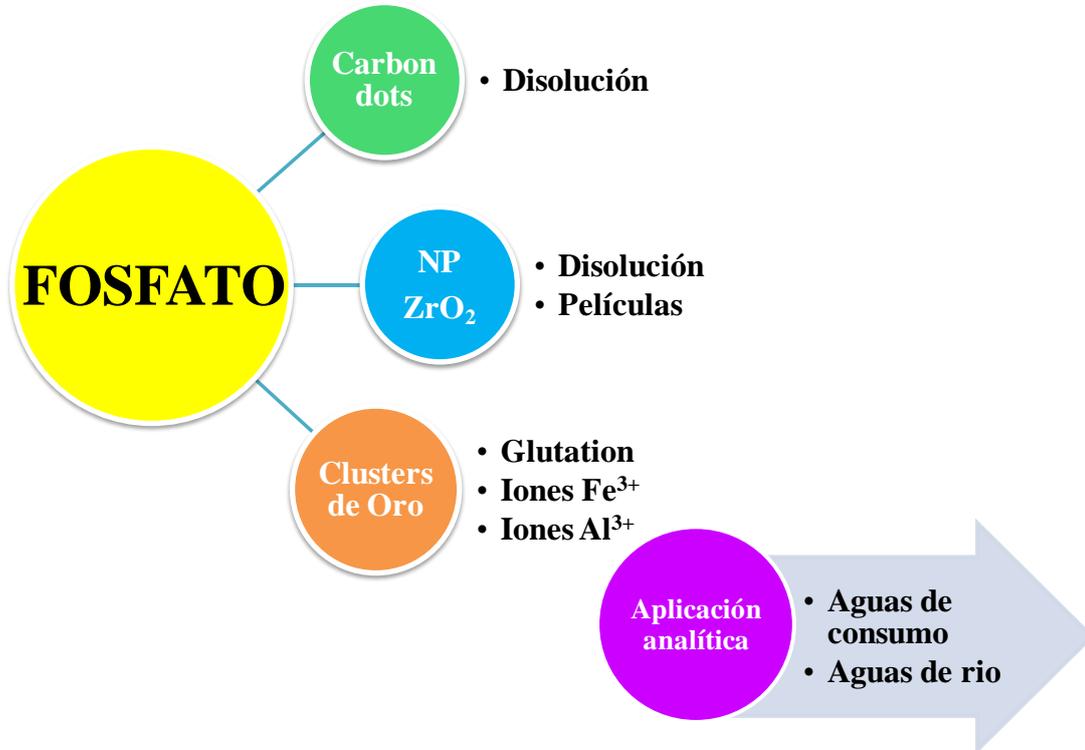
Aunque los fosfatos no son tóxicos para personas ni animales, es importante su control para comprobar no sólo la calidad de las aguas sino también el buen funcionamiento de los procesos de depuración de aguas. Los métodos de análisis convencionales para la determinación de fosfatos en aguas se basan en la determinación colorimétrica del anión por formación de ácido molibdofosfórico y su reducción a azul de fosfomolibdeno [20-22]. Se han descrito varias modificaciones de este método con objeto de mejorar la selectividad y la sensibilidad del mismo, tales como el método del verde de malaquita [23], el método de la Rodamina B [24], el método de la tiamina [25] y el método del luminol [26]. Una de las principales interferencias de estos métodos es el anión silicato debido a la formación del azul de silicomolibdeno. El empleo de bajas temperaturas o de agentes enmascarantes del silicato, como es el ácido tartárico han demostrado ser medios adecuados para minimizar esta interferencia [26, 27].

Determinación de aniones en aguas de consumo empleando nanopartículas fluorescentes

Con todas estas premisas, hemos planteado las siguientes hipótesis en nuestro plan de trabajo:

1. Estudiar el potencial de nanopartículas de ZrO_2 , que poseen características fluorescentes como medio para determinar fosfatos, empleando las nanopartículas tanto en disolución como inmovilizadas en geles.
2. Evaluar la posible interacción de carbon-dots en disolución con iones fosfatos y estudiar sus características con fines analíticos.
3. Emplean nanoclusters de oro funcionalizados con glutation en presencia de iones férricos o de aluminio como sistema fluorescente para la determinación de fosfatos en disolución.
4. Optimizar los parámetros analíticos del sistema que ofrezca mayor potencial para la determinación de fosfatos en aguas y su aplicación a muestras reales.

En el Esquema 1 se muestran los principales hitos del trabajo.



Esquema 1 Plan general de trabajo

3. Parte experimental

3.1. Reactivos y disoluciones

- Hidrogeno fosfato de sodio 99,2 % VWR.
- N-Heptano 95 % Romil.
- Hidróxido de sodio (NaOH) 30 % VWR
- Etanol Absoluto J.T. Baker
- Tricine Hopkin & Williams
- MES Sigma
- TRIS 99,9% Aldrich
- Hidróxido de sodio en escamas 99% VWR
- Poly(diallyldimethylamonium chloride) disolución (PDMADA) MW<100000 35% Aldrich
- Dodecil sulfato sódico (SDS) 72% Sigma
- Cloruro de aluminio PRO-BUS
- Cloruro de hierro anhidro >97% Sigma-aldrich
- Tetraetil ortosilicato (TEOS) $\geq 99\%$ Aldrich
- D(+) Glucosa VWR
- Polietilen glicol 200MW 99,9% Sigma
- Tetracloro aurato trihidratado 99,9% Aldrich
- L-Glutation reducido $\leq 98\%$
- Ácido clorhídrico 38% J.T. Baker y Aldrich

3.2. Instrumentacion analítica

- Balanza Analítica Mettler AE 163
- Fluorímetro Varian Cary Eclipse.
- pH metro: Crison micropH 2002
- Espectrofotómetro visible – ultravioleta – infrarrojo cercano Perkin Elmer Lambda 900.
- Espectrofluorímetro de tiempo resuelto Edimburgh Instruments FLS920 Series
- HRTEM: Jeol JEM 2100F

Determinación de aniones en aguas de consumo empleando nanopartículas fluorescentes

- TEM: MET Jeol-2000 EX-II

3.3. Utillaje de laboratorio

- Baño de ultrasonidos: Selecta Ultrasons MEDI-II.
- Celda de cuarzo para medidas fluorimétricas.
- Micropipetas LABMATE +: 0,5-10 μL , 10-100 μL , 20-200 μL , 100-1000 μL .
- Spin-coating: Laurell technologies corporation MODEL WS-400B-6NPP/LITE/OND.
- Placa calefactora: Heidolph MR-Hei Tec.
- Estufa. Function line. Heraeus.
- Vortex Labnet VX-100
- Tubos de ensayo de 10 mL.
- Pipeta aforada clase A 10 mL.
- Matraces aforados clase A 10-25-50-100-500-1000 L.
- Tubos ependorf de 2 mL.
- Placas petri 145/20 mm.
- Portamuestras 2x2 cm.
- Pipeta pasteur.
- Vaso de precipitados: 10-100-250-500 mL.
- Pinzas metálicas.

3.4. Síntesis de carbon dots

La síntesis de los carbón-dots se llevó a cabo de acuerdo al procedimiento descrito por Zhu y col. [28]. Se preparó una mezcla conteniendo 20 mL polietilen glicol, 6 mL de agua milliQ y 4 g de glucosa. La mezcla homogénea se sometió a calentamiento en microondas (300W, 2 min), tras lo cual se dejó enfriar. La disolución obtenida constituye la disolución estándar a partir de la cual se prepararon las de trabajo.

3.5. Síntesis de nanoclusters de oro modificados con glutation.

La síntesis de nanoclusters de oro modificados se llevó a cabo empleando una modificación del protocolo descrito Li y col. [29]. 1 mL de una disolución 2,5 mM de HAuCl_4 se adicionó a 1 mL de una disolución 2,5 mM de GSH y la mezcla se agitó

Determinación de aniones en aguas de consumo empleando nanopartículas fluorescentes

durante 36 horas a 32°C. Posteriormente, se adicionó 1 mL de GSH 2,5 mM y se agitó nuevamente durante 6 horas. La disolución resultante constituye la disolución estándar de trabajo.

3.6. Preparación de nanopartículas de ZrO₂ inmovilizadas en películas de gel.

Para la inmovilización de las nanopartículas de ZrO₂ se preparó previamente el gel. Para ello, en un vial se adicionaron 120 µL TEOS, 60 µL H₂O, 200 µL etanol y 20 µL HCl 0.1 M y se agitó la mezcla durante 1 h a 500 rpm, tras lo cual se adicionaron 400 µL de una disolución al 4% de PDMADA. Se agitó nuevamente la mezcla a 500 rpm durante 1h, después de lo cual se adicionaron 0,8 mg de nanopartículas de ZrO₂ y se homogeneizó la muestra en un baño de ultrasonidos.

Antes de ser utilizados, los portamuestras de vidrio se someten a un proceso de limpieza y de activación: se sumergen durante una hora en una disolución de NaOH al 30% (10M), tras lo cual se lavan exhaustivamente con agua destilada, finalmente con agua milliQ y se dejan secar.

Para la preparación de los films, se siguieron dos procedimientos. En el primero, sobre un portamuestras de vidrio de 2x2 cm se depositaron 20 µL de la preparación anterior y se sometieron a spin-coating a 1000 rpm durante 20 s. En el segundo, sobre un portamuestras de vidrio de 2x2 cm se depositaron 20 µL de la anterior preparación y se extendieron homogéneamente sobre la superficie del vidrio. En ambos casos, se dejaron curar los films durante 10 h.

4. Resultados y discusión

4.1. Nanopartículas de ZrO_2

4.1.1. Caracterización de las nanopartículas de ZrO_2

Antes de proceder a su utilización, se llevó a cabo la caracterización de las nanopartículas de ZrO_2 comerciales. Para ello, se preparó una suspensión de nanopartículas (12 mg ZrO_2) en 100 mL de heptano conteniendo 36 mg de SDS y se registraron los espectros de absorción Vis-UV, de fluorescencia. Asimismo, se registraron las imágenes TEM de las nanopartículas suspendidas en heptano (en ausencia de SDS). Los resultados mostraron que en la región visible-ultravioleta las nanopartículas no presentan bandas de absorción de interés analítico, mientras que presentan dos bandas de fluorescencia, una a 350 nm y 365 nm, cuando se excitan a 298 nm (Figura 14). Por su parte, las imágenes TEM muestran que las nanopartículas son aproximadamente esféricas con diámetros que oscilan entre 20 y 30 nm (Figura 15).

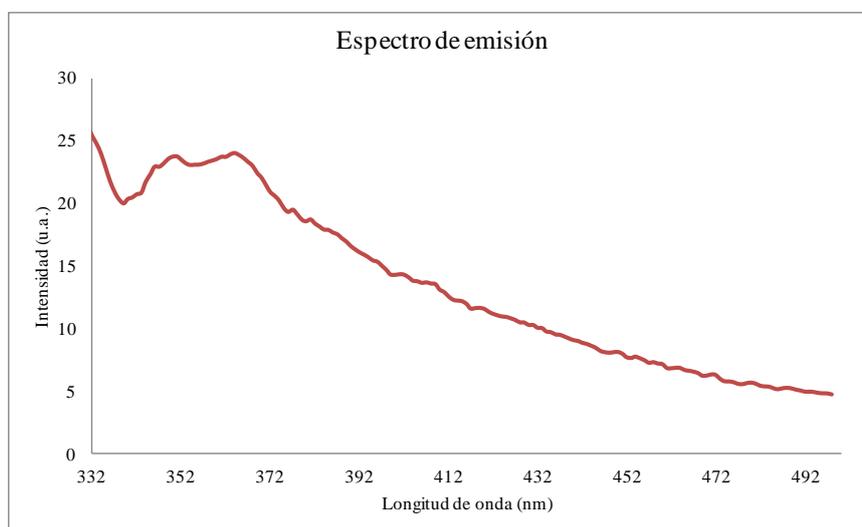


Figura 14: Espectro de emisión de las nanopartículas de ZrO_2

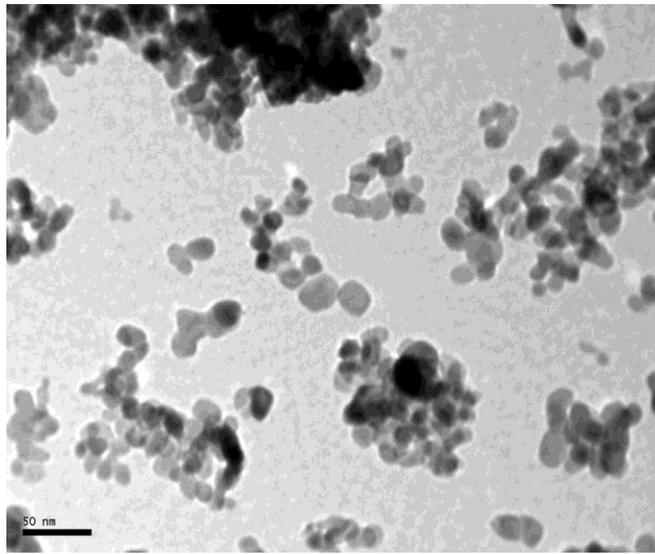
Determinación de aniones en aguas de consumo empleando nanopartículas fluorescentes

Figura 15 Imagen TEM de nanopartículas de ZrO_2

4.1.2. Ensayos en disolución.

Para estudiar la interacción de las nanopartículas de ZrO_2 con los iones fosfato en disolución, se suspendieron en 100 mL de una disolución reguladora Tricine de pH 7,6 0,27 mg de ZrO_2 y 0,3930 g de SDS. Esta suspensión de nanopartículas de ZrO_2 se utilizó directamente en los estudios posteriores. Las nanopartículas se mantienen en suspensión gracias a la adición del detergente SDS.

La interacción de iones fosfato a pH 7 con las nanopartículas de ZrO_2 se estudió empleando una cantidad fija de la suspensión de nanopartículas y cantidades crecientes de fosfato. Para ello, en matraces de 10 mL se adicionaron los volúmenes de cada una de las disoluciones de fosfato y nanopartículas que se recogen en la Tabla 1. Se llevó a volumen con disolución reguladora Tricine de pH 7. Se registraron los espectros de fluorescencia de cada una de las disoluciones empleando una longitud de onda de excitación de 298 nm.

Determinación de aniones en aguas de consumo empleando nanopartículas fluorescentes

mL suspensión nanopartículas de ZrO ₂	μL disolución HPO ₄ ⁼ , 695 mg L ⁻¹	Concentración HPO ₄ ⁼ , mg L ⁻¹
4.6	0	0
4.6	29,3	2,0
4.6	58,6	4,1
4.6	88	6,1
4.6	117,2	8,1

Tabla 1 Composición de las disoluciones de nanopartículas de ZrO₂ y HPO₄⁼

En la Figura 16 se muestran los espectros de emisión de cada una de las anteriores disoluciones. Como se puede apreciar, se observa una primera banda de emisión a 330 nm, correspondiente al Raman del agua y dos bandas de menor intensidad a 350 y 365 nm. No se observan cambios sustanciales en las características espectrales de las nanopartículas de ZrO₂ (blanco) con concentraciones crecientes de iones HPO₄⁼. A la luz de estos resultados, se puede concluir que no parece haber una interacción notable entre ambas especies al pH estudiado.

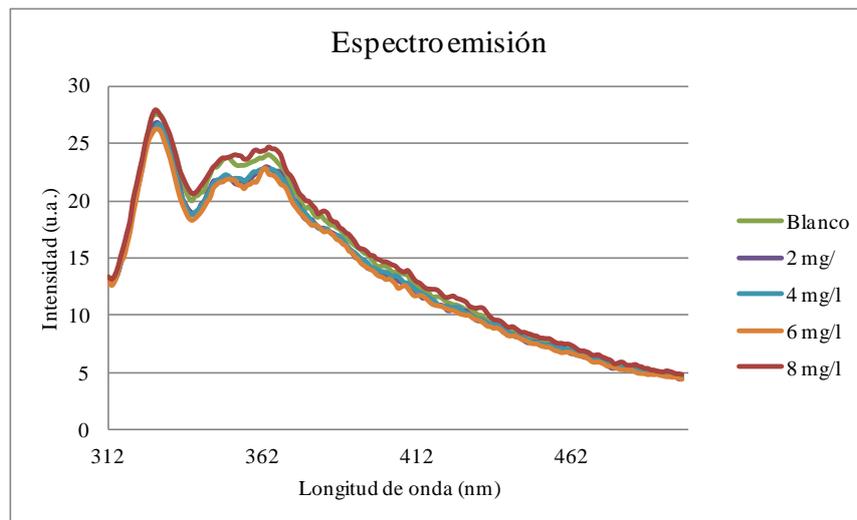


Figura 16 Espectros de emisión de suspensiones de nanopartículas de ZrO₂ en presencia de iones HPO₄⁼

Determinación de aniones en aguas de consumo empleando nanopartículas fluorescentes**4.1.3. Ensayos con nanopartículas de ZrO_2 inmovilizadas en soportes sol-gel.****a) Películas preparadas por spin-coating.**

Se prepararon seis películas con porcentajes crecientes de nanopartículas de ZrO_2 (0,125, 0,69, 1,25, 2,5, 4,5 y 5,5 % ZrO_2) de acuerdo al procedimiento indicado en la parte experimental (sección 3.6). Se registraron los espectros de fluorescencia en el espectrofluorímetro de tiempo resuelto Edinburgh Instruments FLS920 Series (dispone de corrección de espectros) de cada una de estas películas, con objeto de seleccionar aquella que presentaba los valores de intensidad más elevados. Las películas se dispusieron en un accesorio especial para la sujeción de las mismas en el paso de luz (Figura 17). Los resultados mostraron que presentan una banda de excitación a una longitud de onda máxima de $\lambda_{exc} = 272$ nm y una banda de emisión máxima a $\lambda_{em} = 372$ nm (Figura 18).

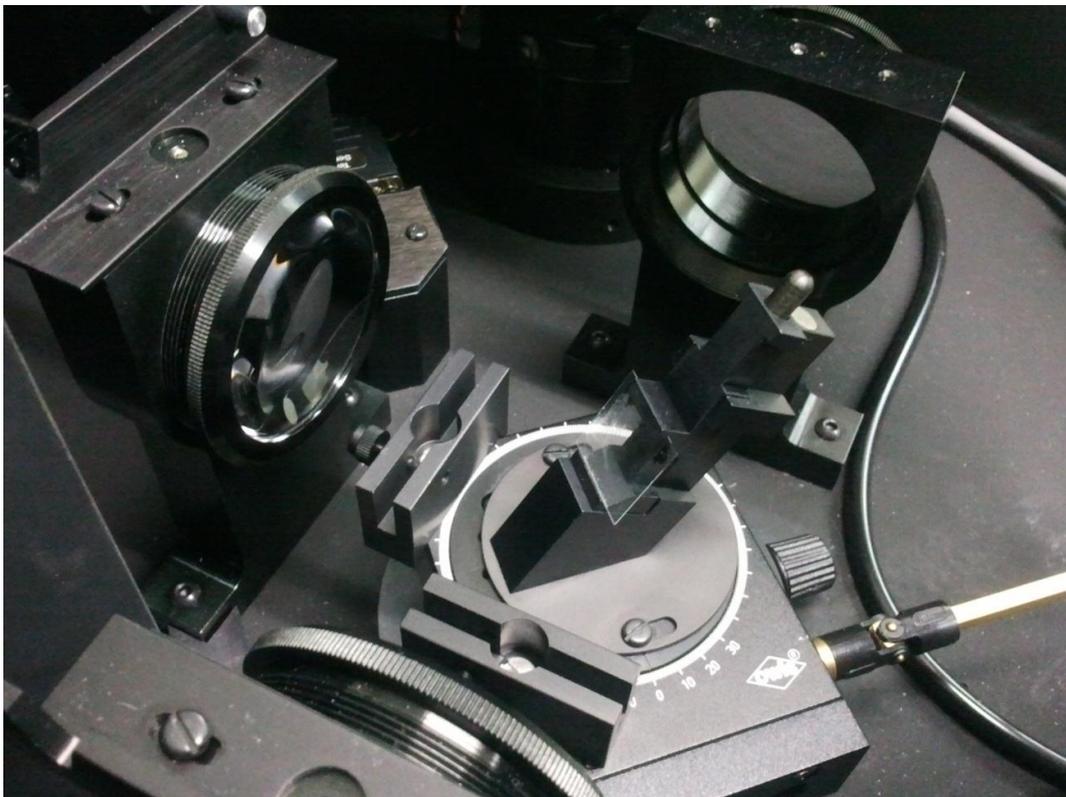


Figura 17 Accesorio del fluorímetro de tiempo resuelto Edinburgh Instruments FLS920 Series para la disposición de películas.

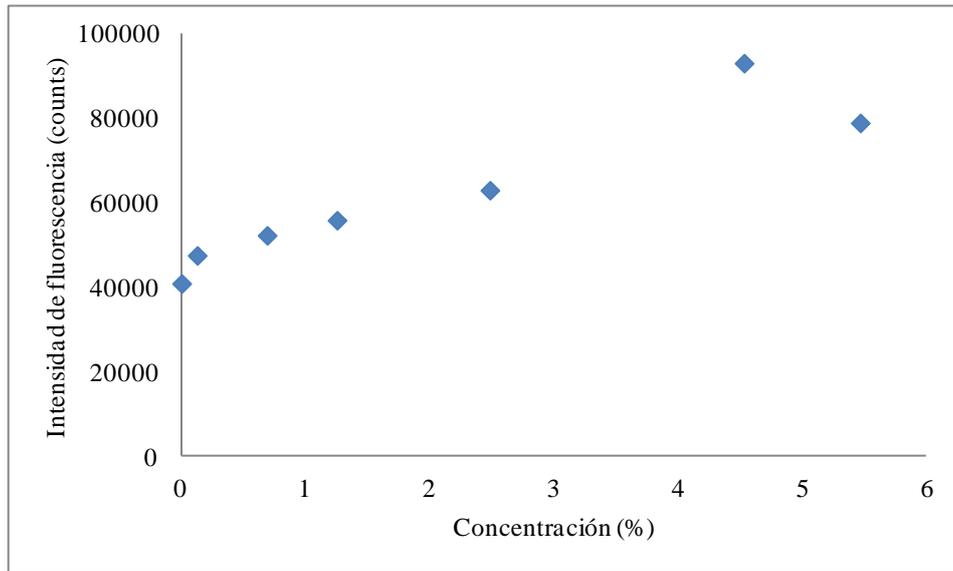
Determinación de aniones en aguas de consumo empleando nanopartículas fluorescentes

Figura 18 Intensidad de fluorescencia de películas con cantidades crecientes de ZrO_2

El desplazamiento observado de las bandas espectrales de las nanopartículas de ZrO_2 inmovilizadas respecto a las nanopartículas en disolución no es significativo y puede ser debido a la corrección espectral que realiza el equipo instrumental. Por otra parte, la intensidad de fluorescencia crece moderadamente a medida que aumenta el contenido en nanopartículas. En los estudios posteriores, se utilizaron películas conteniendo alrededor de un 1% de ZrO_2 , debido a la buena dispersión de las mismas en las películas y una señal fluorescente reproducible.

b) Comparación de películas preparadas por spin-coating y por recubrimiento homogéneo.

Tras seleccionar la cantidad óptima de nanopartículas ZrO_2 por spin-coating se procedió a la preparación de películas por recubrimiento homogéneo conteniendo la misma cantidad de nanopartículas y se registraron también los espectros de fluorescencia. Como se muestra en la Figura 19, las películas preparadas por recubrimiento homogéneo presentan señales de fluorescencia más intensas que las preparadas por spin-coating. Este hecho, puede adscribirse a un mayor espesor de la película homogénea. En los estudios posteriores se evaluaron las películas preparadas por recubrimiento homogéneo conteniendo 1% ZrO_2 .

Determinación de aniones en aguas de consumo empleando nanopartículas fluorescentes

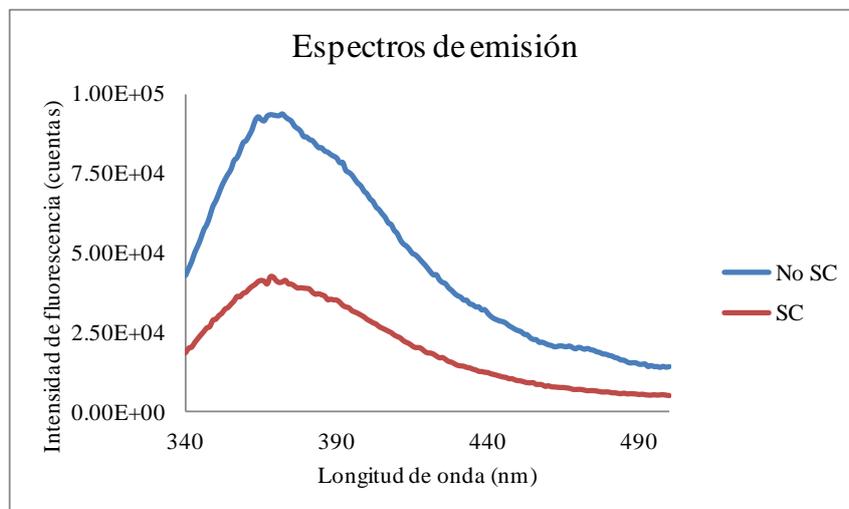


Figura 19 Espectros de fluorescencia de láminas preparadas por spin-coating y recubrimiento homogéneo. Porcentaje de nanopartículas: 1% ZrO_2

c) Estudio de la interacción de películas homogéneas de nanopartículas de ZrO_2 con iones HPO_4^- .

Se prepararon 8 películas homogéneas y en 6 de ellas se depositaron 500 μL de una disolución de 1 mg L^{-1} de HPO_4^- preparada en una reguladora de pH 7 (Tricine). Se dejaron reposar 30 min, tras lo cual se lavaron con agua milliQ para eliminar el HPO_4^- no retenido. Se dejaron secar a temperatura ambiente durante 8 horas y se procedió a registrar los espectros de fluorescencia. Las 2 películas restantes se utilizaron como “blanco”, adicionando 500 μL de disolución reguladora de pH 7, en lugar de la disolución de HPO_4^- y sometiénolas al mismo procedimiento experimental de lavado y secado. Se midió la intensidad de fluorescencia a 372 nm ($\lambda_{\text{exc}} = 272$ nm) para cada una de las láminas y se representaron los resultados en función de cada lámina. Como se puede apreciar en la Figura 20, tanto las muestras como los blancos presentan datos altamente dispersos, irreproducibles, lo que nos llevó a descartar las nanopartículas de ZrO_2 inmovilizadas como sistema para el reconocimiento del ion HPO_4^- .

Determinación de aniones en aguas de consumo empleando nanopartículas fluorescentes

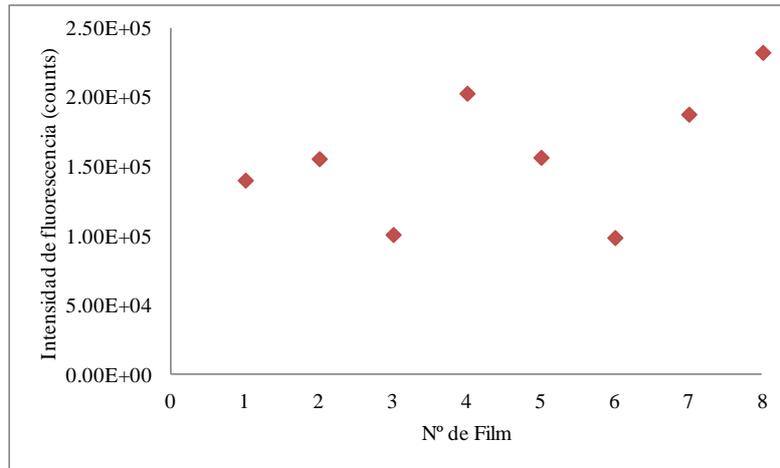


Figura 20 Intensidad de fluorescencia de láminas homogéneas de nanopartículas de ZnO₂ tras su interacción con iones HPO₄²⁻.

4.2. Carbon-dots

4.2.1. Caracterización de los carbón-dots por fluorescencia.

Los carbón-dots preparados de acuerdo al procedimiento operatorio descrito en la sección 3.4, se caracterizaron por espectrofotometría de fluorescencia. Para ello, se prepararon disoluciones en matraces de 10 mL conteniendo 0.5 mL de la disolución estándar de carbón-dots y llevando a volumen con disolución reguladora de pH. Se emplearon dos reguladoras: MES 0.01 M de pH 5,65 y Tricine 0.01 M de pH 7,6. Para ajustar pH 12 se utilizó NaOH 0,1 M. Se registraron los espectros de cada una de estas disoluciones, empleando una longitud de onda de excitación de 342 nm.

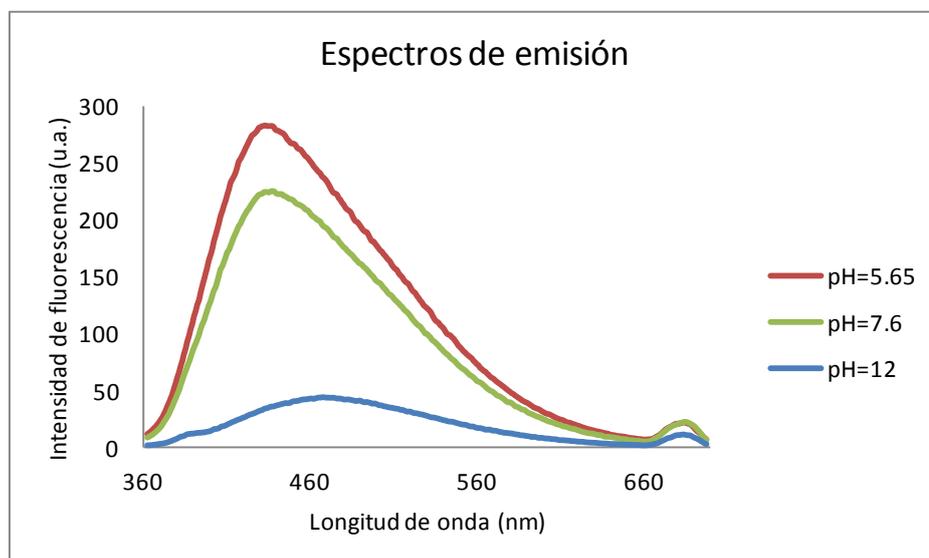


Figura 21 Espectros de emisión de carbón-dots a diferentes pHs.

Determinación de aniones en aguas de consumo empleando nanopartículas fluorescentes

Como se puede comprobar, el máximo de emisión aparece a 434 nm, siendo en el intervalo de pH 5,65-7,6 donde se observa mayor intensidad. A pH 12 los carbón-dots no emiten fluorescencia analíticamente útil.

4.2.2. Interacción de los carbón-dots con las especies de fósforo.

Una vez comprobadas las características espectrales de los carbón-dots a diferentes pHs, se procedió a estudiar su interacción con los iones fosfato presentes en cada uno de los pHs estudiados. Como es bien sabido, el fósforo se presenta en formas químicas diferentes dependiendo del pH [30]. En la Figura 22 se muestra el diagrama de equilibrio en función del pH [31].

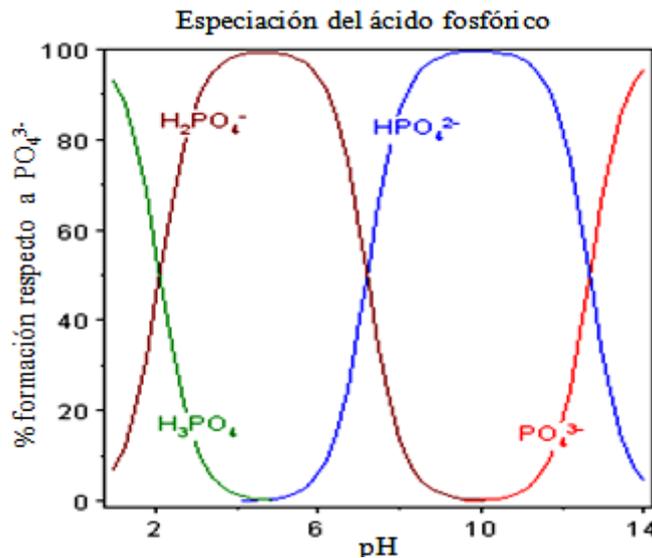


Figura 22 Diagrama de estabilidad de las diferentes especies derivadas del ácido fosfórico en función del pH. Adaptada de referencia [31].

Para llevar a cabo el ensayo de interacción, se prepararon en matraces de 10 mL disoluciones conteniendo 0.5 mL de la disolución estándar de carbón-dots y cantidades crecientes de disoluciones del correspondiente ión, llevando a volumen con la disolución reguladora de pH en estudio. A continuación, se registran los correspondientes espectros de emisión y se representa gráficamente la intensidad de emisión a 434 nm en función de la concentración del ión. En la Figura 23 se muestran los datos obtenidos a pH 5,65, en la que se puede observar que a medida que aumenta la

Determinación de aniones en aguas de consumo empleando nanopartículas fluorescentes

concentración del ión H_2PO_4^- (especie predominante en el intervalo de pH 4-6), la intensidad de fluorescencia disminuye.

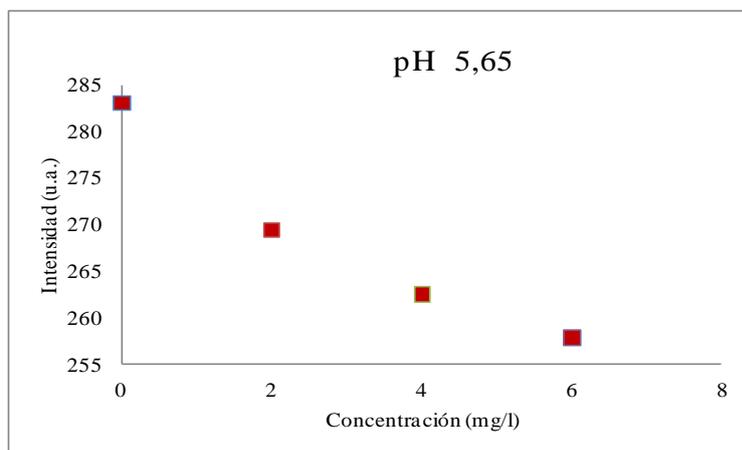


Figura 23 Desactivación de la fluorescencia de los carbón-dots en función de la concentración de H_2PO_4^- .

De igual modo, a pH 7,6 se observa una clara disminución de la señal de fluorescencia a medida que aumenta la concentración de ión HPO_4^- (Figura 24), que es la especie mayoritaria a ese pH (80% de HPO_4^- frente a un 20% de la especie H_2PO_4^-).

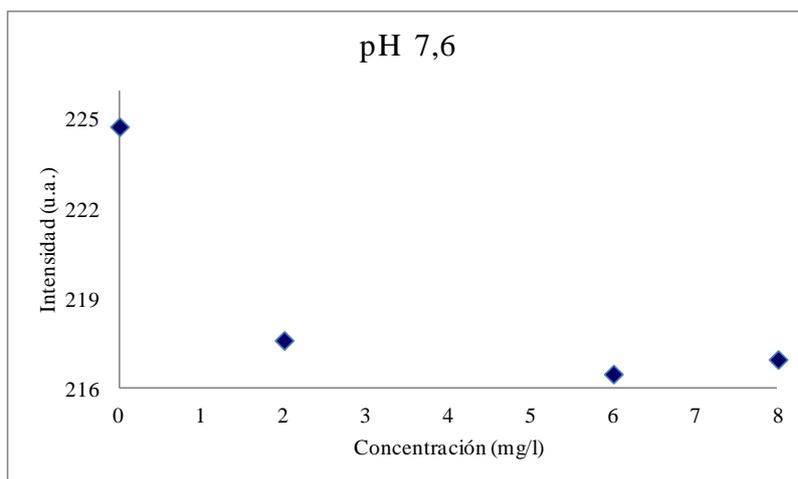


Figura 24 Desactivación de la fluorescencia de los carbón-dots en función de la concentración de HPO_4^- .

Determinación de aniones en aguas de consumo empleando nanopartículas fluorescentes

Finalmente, a pH 12, donde la especie predominante es el ión PO_4^{3-} , se obtuvo una elevada dispersión en los datos (Figura 25), no observándose una correlación en función de la concentración.

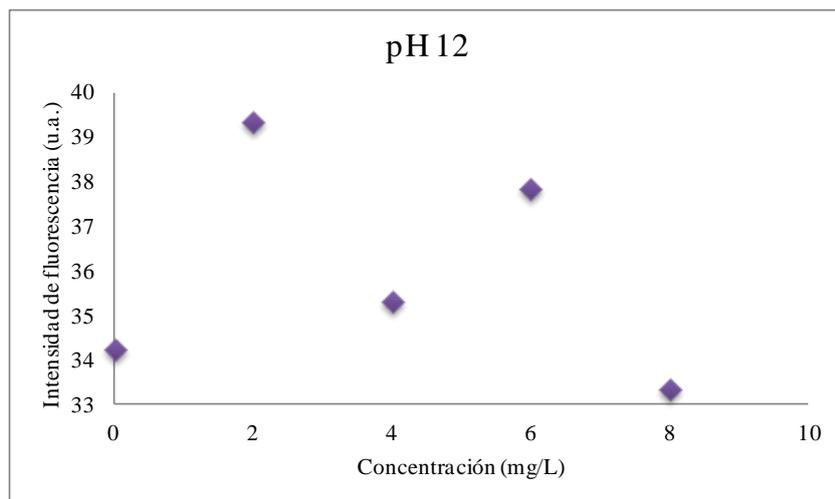


Figura 25 Intensidad de fluorescencia de carbón-dots en función de la concentración de ión PO_4^{3-}

A la luz de los resultados obtenidos, se puede concluir que en el intervalo de pH estudiado, la interacción de las especies de fósforo con carbón-dots no ofrece potencial para el desarrollo de métodos fluorescentes para ninguna de ellas. En primer lugar, los métodos basados en desactivación de la fluorescencia no suelen ser selectivos y, por otra parte, las señales de fluorescencia obtenidas en estas experiencias son relativamente bajas, lo que limitaría la sensibilidad de los métodos.

4.3. Clusters de oro modificados con glutatión (GSH).

4.3.1. Caracterización de los clusters.

Los clusters de oro modificados con GSH se caracterizaron por fluorescencia molecular. Para ello, en viales de 3 mL se dispusieron 1 mL de la disolución estándar (obtenida según se detalla en 3.5) y se llevó a volumen con disolución reguladora de Tris 0.1 M de pH 7,4. Se registraron los espectros de emisión y excitación, observándose una banda de

Determinación de aniones en aguas de consumo empleando nanopartículas fluorescentes

excitación con máximo a 396 nm y una intensa banda de emisión con máximo a 620 nm. En la Figura 26 se muestra el espectro de emisión del sistema.

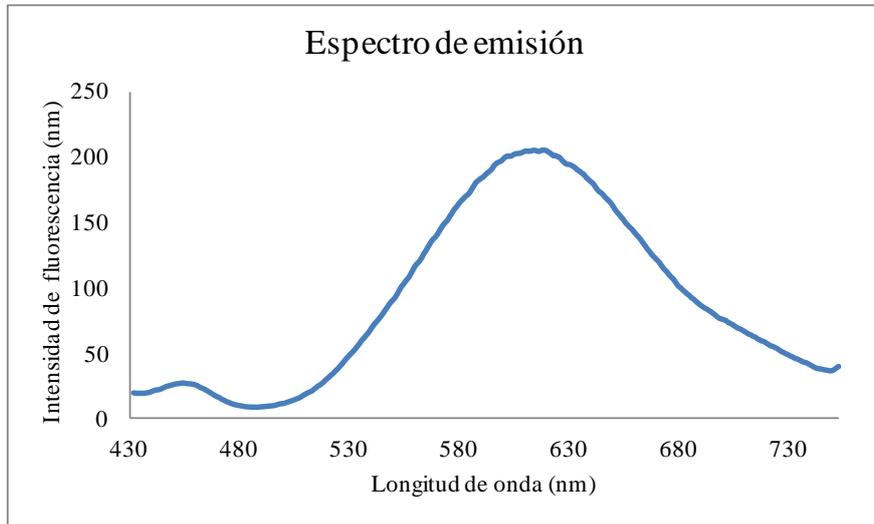


Figura 26 Espectro de emisión de clusters Au-GSH. $\lambda_{exc}= 396 \text{ nm}$.

A continuación se obtuvieron las imágenes HR-TEM de los clusters Au-GSH. Como se puede observar en la Figura 27, los clusters están formados por agregados nanométricos ($4 \pm 2 \text{ nm}$, 527 cuentas), de geometría aproximadamente esférica. Las imágenes también muestran una disposición ordenada de los átomos, observándose planos preferenciales.

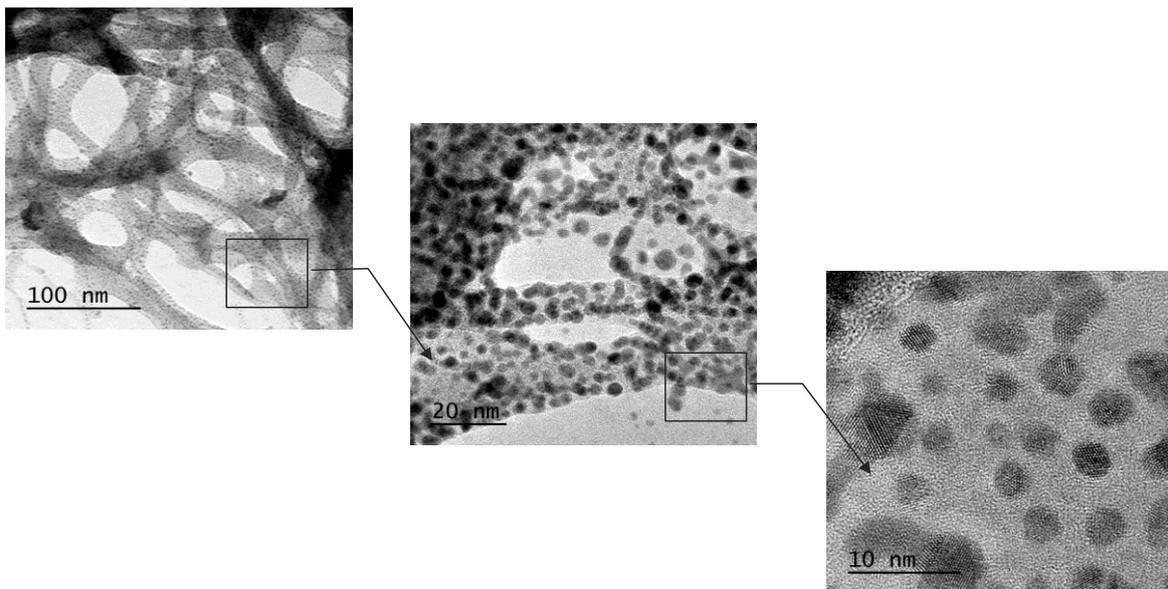


Figura 27 Imágenes HR-TEM de clusters Au-GSH

Determinación de aniones en aguas de consumo empleando nanopartículas fluorescentes

4.3.2. Interacción de los clusters Au-GSH modificados con iones Fe(III).

Para llevar a cabo este estudio, previamente se evaluó la interacción de los iones Fe(III) con los clusters Au-GSH. En viales de 3 mL se dispusieron 1 mL de la disolución estándar de clusters Au-GSH, 10 μ L de una disolución de 0.25 mM de FeCl₃ y se llevó a volumen con disolución reguladora Tris 0,1 M de pH 7,4. Se registró el espectro de emisión de fluorescencia excitando la muestra a 396 nm. Como se puede observar en la Figura 28, la intensidad de fluorescencia a 620 nm disminuye drásticamente en presencia de iones Fe(III) y aparecen dos nuevos máximos de emisión a 532 nm y 686 nm, respectivamente. Asimismo, se puede comprobar que la banda a 532 nm es la más intensa de las tres.

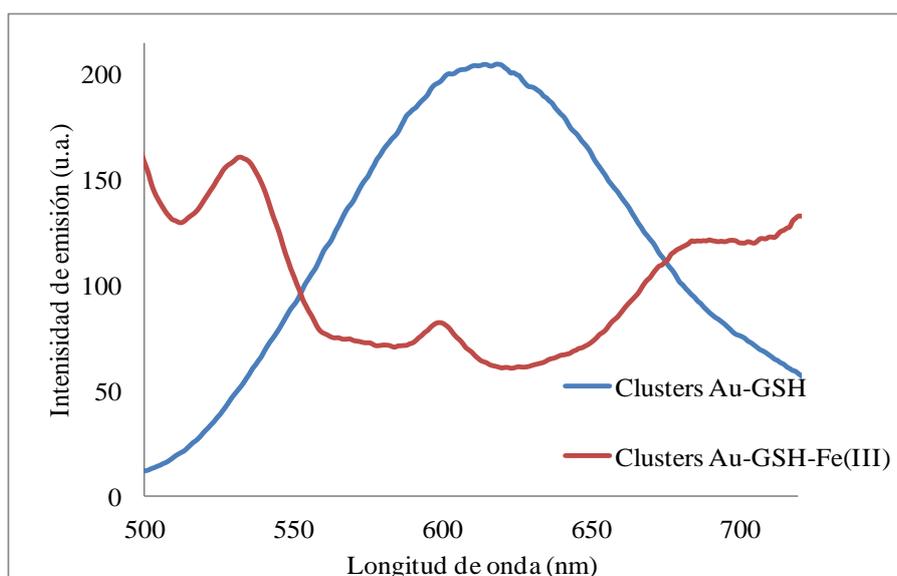


Figura 28 Espectros de emisión de fluorescencia de los clusters Au-GSH en presencia y ausencia de iones Fe(III).

4.3.3. Interacción de los clusters Au-GSH-Fe(III) con iones HPO₄⁼

Los clusters Au-GSH-Fe(III) se pusieron en contacto con iones HPO₄⁼ con objeto de evaluar su posible reconocimiento, dada la afinidad de los mismos por los iones Fe(III). Para ello, se siguió un protocolo análogo al descrito por Li y col. [29]. En la celdilla de fluorescencia se dispusieron 1 mL de la disolución estándar de cluster Au-GSH y 1 mL

Determinación de aniones en aguas de consumo empleando nanopartículas fluorescentes

de disolución reguladora Tris 0.1M pH 7,4. Se registró el correspondiente espectro de emisión ($\lambda_{exc} = 396$ nm). A continuación se adicionó 10 μ L de una disolución 0.025 M $FeCl_3$, se agitó suavemente y se registró nuevamente el espectro de emisión, empleando la misma longitud de onda de excitación. A partir de este momento, se adicionan sucesivamente diferentes volúmenes de una disolución de Na_2HPO_4 (42 mg L^{-1}) a pH 7,4 (Tris 0,1 M). Entre adición y adición, se agita suavemente la disolución y se registran los correspondientes espectros de emisión. En la Figura 29 se muestran los espectros obtenidos y en la Figura 30 se han representado las intensidades de fluorescencia a tres máximos de emisión: 532, 600 y 686 nm, una vez corregida la señal para la variación de volumen. La banda a 600 nm corresponde a la de los clusters Au-GSH (620 nm) que ha desplazado hacia el azul, como se puede apreciar en la Figura 29.

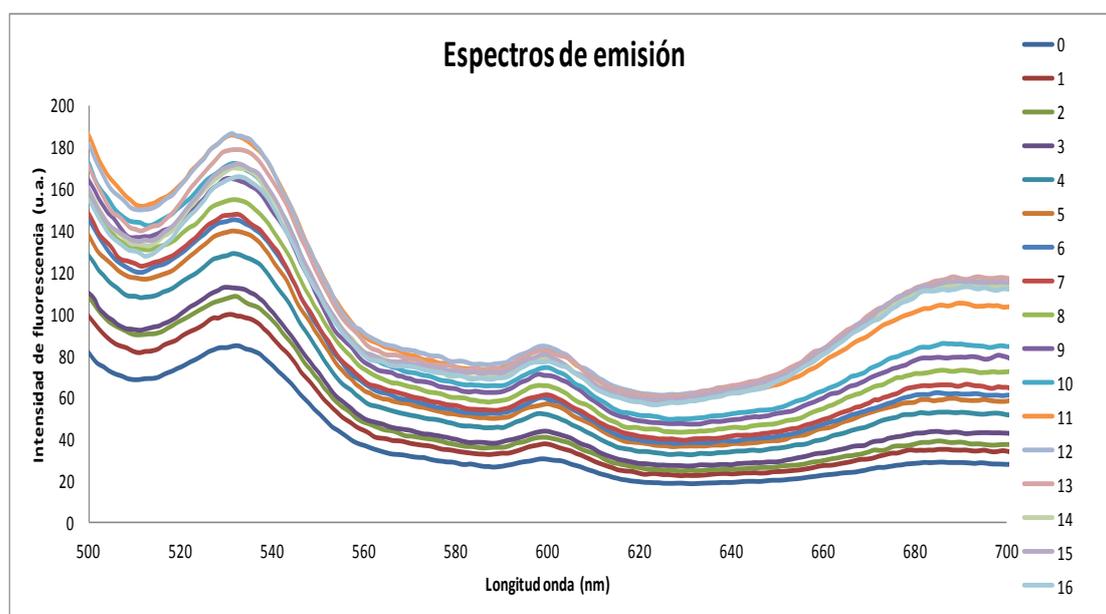


Figura 29 Espectros de emisión de los clusters de Au-GSH en presencia de $Fe(III)$ y adiciones sucesivas de aniones HPO_4^{2-} .

Determinación de aniones en aguas de consumo empleando nanopartículas fluorescentes

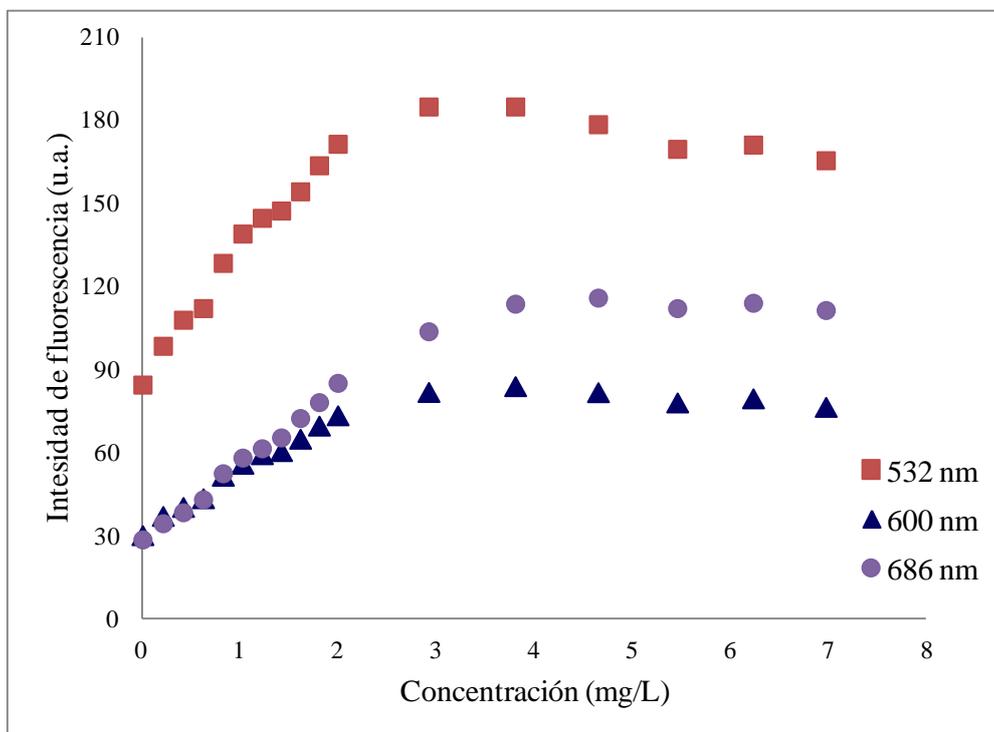


Figura 30 Intensidad de emisión de los clusters Au-GSH-Fe(III) en presencia de cantidades crecientes de $\text{HPO}_4^{=}$ a diferentes longitudes de onda de emisión. $\lambda_{\text{exc}} = 396$ nm.

De la Figura 30 se desprende que en el intervalo de concentraciones de $0,2\text{-}2\text{ mg L}^{-1}$ de $\text{HPO}_4^{=}$, existe una relación lineal entre la intensidad de fluorescencia y la concentración. Por encima de 2 mg L^{-1} la señal de fluorescencia se mantiene sensiblemente constante debido, probablemente, a que se ha alcanzado el equilibrio de reacción entre los iones Fe(III) presentes (desactivantes de la fluorescencia de los clusters Au-GSH) y los iones fosfato. En la Tabla 2 se resumen las ecuaciones de las correspondientes líneas de calibrado y los intervalos de concentración utilizados.

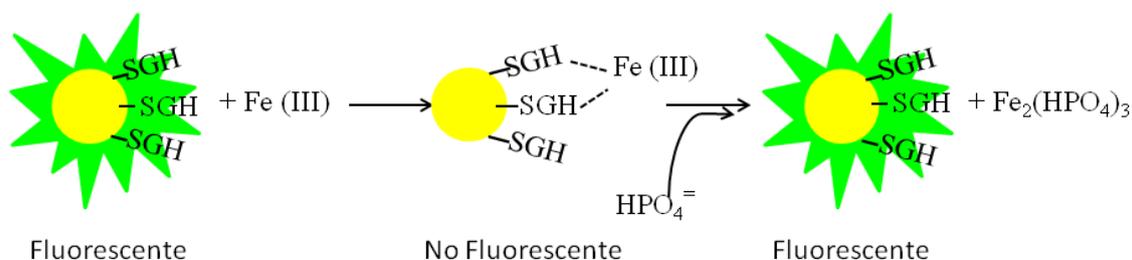
Determinación de aniones en aguas de consumo empleando nanopartículas fluorescentes

Longitud de onda emisión (nm)	Intervalo de concentración (mg L ⁻¹)	Ecuación del calibrado	R ²
532	0,2-2	$y = 38,096x + 91,232$	0,9778
600	0,2-2	$y = 19,135x + 33.062$	0,9948
686	0,2-2	$y = 25,401x + 29,126$	0,9842

Tabla 2 Resumen de las ecuaciones de cada línea de calibrado en su respectiva longitud de onda así como su coeficiente de correlación lineal (R²) y el intervalo de concentraciones aplicable.

Como conclusión de estos estudios, podemos afirmar que los clusters Au-GSH-Fe(III) presentan un potencial analítico interesante para la determinación de iones HPO₄⁼ a pH 7,4.

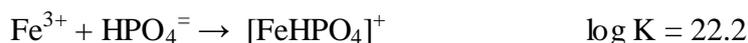
El mecanismo probable a través del cual tiene lugar la recuperación de la fluorescencia en presencia de los iones HPO₄⁼ y que constituye la base del método de análisis, se resume en el Esquema 2.



Esquema 2 Mecanismo de interacción entre los clusters Au-GSH con el Fe(III) y la posterior adición de HPO₄⁼ y su efecto en la fluorescencia del sistema

Los iones Fe(III) pueden interaccionar con los grupos -COOH libres del GSH y, dada la naturaleza paramagnética de aquellos (número cuántico de spin S= 2,5) [32] se produciría la desactivación de la fluorescencia de los clusters Au-GSH. Los iones paramagnéticos son potentes desactivantes de la fluorescencia. Por su parte, los iones HPO₄⁼ a pH 7,4 adicionados reaccionan con los iones Fe(III), eliminando así su acción desactivante, proporcionalmente a su concentración. Esta reacción está favorecida por la elevada constante de formación del complejo [33]:

Determinación de aniones en aguas de consumo empleando nanopartículas fluorescentes



4.3.4. Interacción de los clusters Au-GSH modificados con iones Al(III).

Con objeto de estudiar la interacción de los clusters Au-GSH con iones no-paramagnéticos, hemos tomado como modelo el Al(III). Para ello, en viales de 3 mL se dispusieron 1 mL de la disolución estándar de clusters Au-GSH, 10 μL de una disolución de 0.25 mM de AlCl_3 y se llevó a volumen con disolución reguladora Tris 0,1 M de pH 7,4. Se registró el espectro de emisión de fluorescencia excitando la muestra a 396 nm. Como se puede observar en la Figura 31, la intensidad de fluorescencia a 620 nm aumenta notablemente en presencia de iones Al(III) y se observa un hombro a 530 nm, aproximadamente.

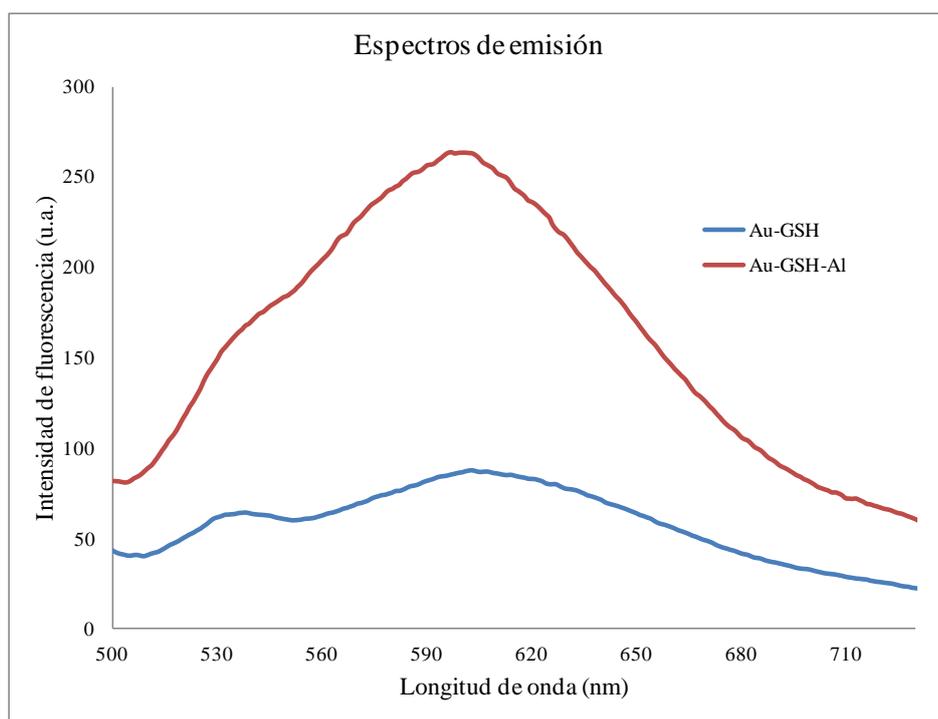


Figura 31 Espectros de emisión de fluorescencia de los clusters Au-GSH en presencia y ausencia de iones Al(III).

Determinación de aniones en aguas de consumo empleando nanopartículas fluorescentes

4.3.5. Experiencias preliminares sobre la interacción de los clusters Au-GSH-Al(III) con iones HPO_4^-

Al igual que en el caso anterior, los clusters Au-GSH-Al(III) se pusieron en contacto con iones HPO_4^- para observar el efecto de los mismos sobre las características espectrales de los clusters modificados. Para ello, se siguió un protocolo análogo al descrito anteriormente. En la celdilla de fluorescencia se dispusieron 1 mL de la disolución estándar de cluster Au-GSH y 1 mL de disolución reguladora Tris 0.1 M pH 7,4. Se registró el correspondiente espectro de emisión ($\lambda_{\text{exc}} = 396 \text{ nm}$). A continuación se adicionó 10 μL de una disolución 0.025 M AlCl_3 , se agitó suavemente y se registró nuevamente el espectro de emisión, empleando la misma longitud de onda de excitación. A partir de este momento, se adicionan sucesivamente diferentes volúmenes de una disolución de Na_2HPO_4 (48,5 mg L^{-1}) a pH 7,4 (Tris 0,1 M). Entre adición y adición, se agita suavemente la disolución y se registran los correspondientes espectros de emisión. En la Figura 32 se muestran los espectros obtenidos y en la Figura 33 se han representado las intensidades de fluorescencia al máximo de emisión de 600 nm en función de la concentración de HPO_4^- , una vez corregida la señal para la variación de volumen.

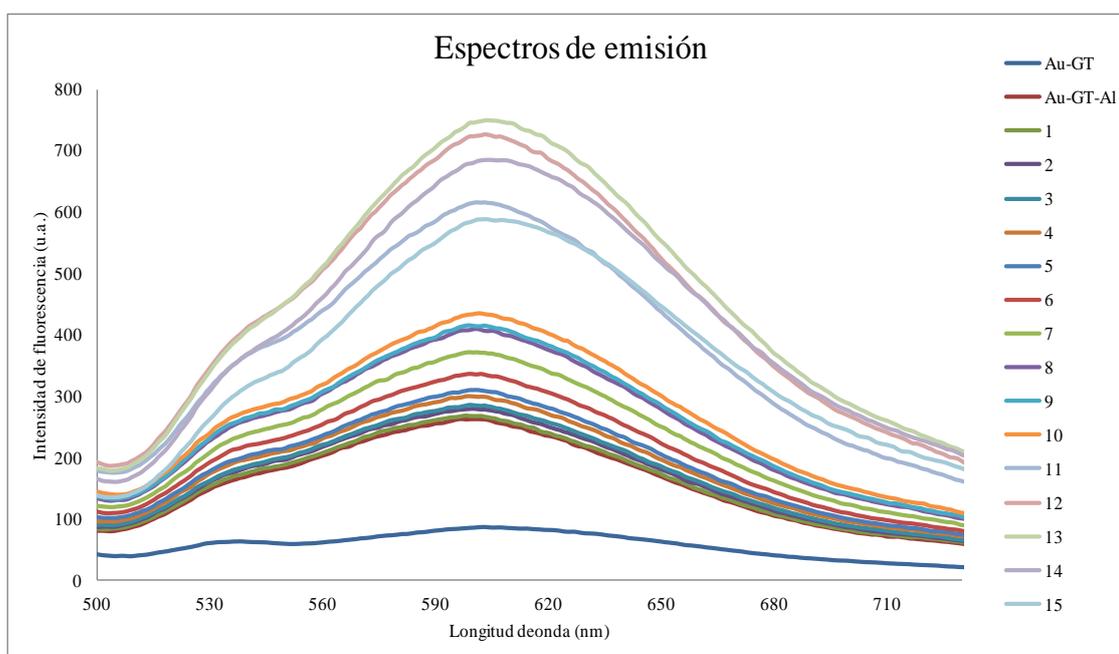


Figura 32 Intensidad de emisión de los clusters Au-GSH-Al(III) en presencia de cantidades crecientes de HPO_4^- a 600 nm siendo $\lambda_{\text{exc}} = 396 \text{ nm}$.

Determinación de aniones en aguas de consumo empleando nanopartículas fluorescentes

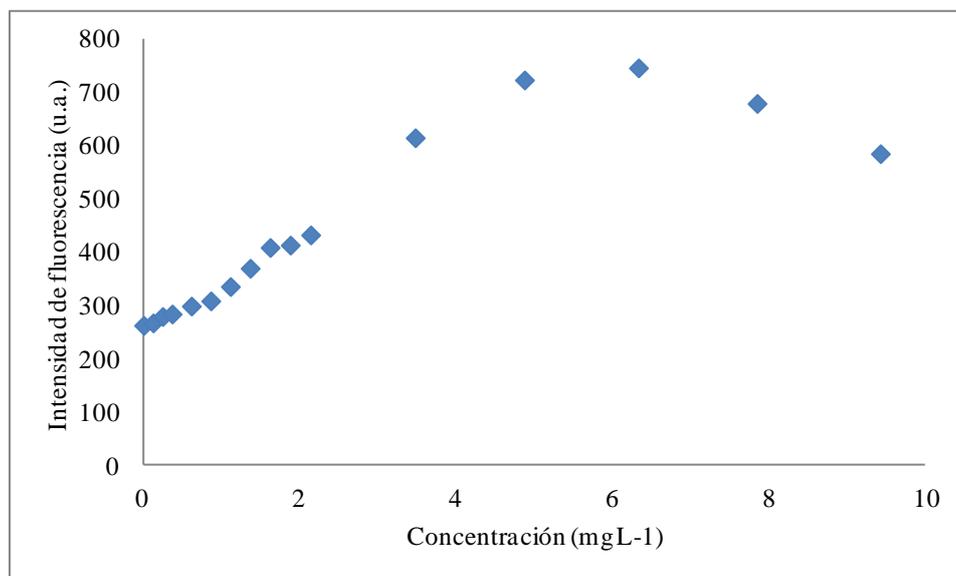


Figura 33 Intensidad de emisión de los clusters Au-GSH-Al(III) en presencia de cantidades crecientes de HPO_4^{3-} a $\lambda_{\text{emi}} = 600 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{exc}} = 396 \text{ nm}$

De estos estudios preliminares (Figura 33) se desprende que en el intervalo de concentraciones de $0,1\text{-}4,5 \text{ mg L}^{-1}$ de HPO_4^{3-} , existe una relación lineal entre la intensidad de fluorescencia y la concentración. Por encima de $4,5 \text{ mg L}^{-1}$ la señal de fluorescencia se mantiene sensiblemente constante debido, probablemente, a que se ha alcanzado el equilibrio de reacción entre los iones Al(III) presentes y los iones HPO_4^{3-} . A concentraciones superiores, se observa un decrecimiento de la señal, debido a un efecto de filtro interno [34]. La ecuación de la recta de calibrado resultó ser:

$$y = 98,503x + 244,12 \quad R^2 = 0,9873$$

Como conclusión de estos estudios, podemos afirmar que los clusters Au-GSH-Al(III) presentan un potencial analítico muy interesante para la determinación de iones HPO_4^{3-} a pH 7,4.

El mecanismo probable a través del cual tiene lugar el incremento de la fluorescencia de los clusters Au-GSH en presencia de los iones Al(III) y de los iones HPO_4^{3-} se resume en el Esquema 3.

Determinación de aniones en aguas de consumo empleando nanopartículas fluorescentes

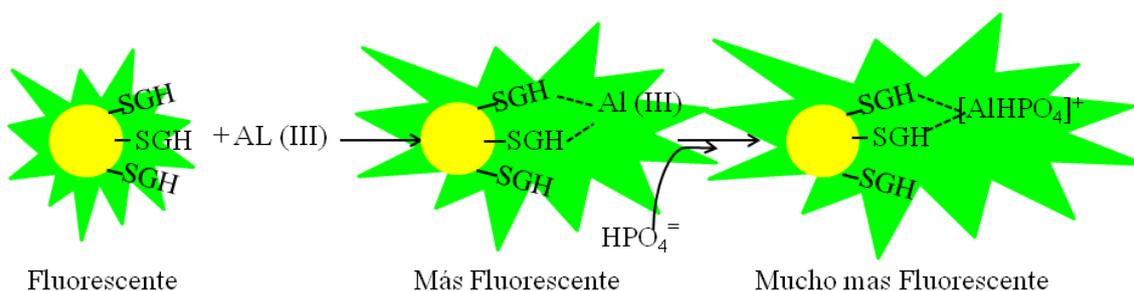


Figura 34 Mecanismo de interacción entre los clusters Au-GSH con el Al(III) y la posterior adición de HPO_4^- y su efecto en la fluorescencia del sistema

En presencia de los iones Al(III) se produce un incremento en la fluorescencia de los clusters Au-GSH gracias a la posible reacción de los iones con grupos $-\text{COOH}$ libres del GSH, que en principio, estabilizaría el sistema. En presencia de iones HPO_4^- a pH 7,4 se formarían complejos mixtos (ternarios) estables con Al(III) gracias a la elevada constante de formación del complejo [35]:



Comparando efecto del Fe(III) con la del Al(III) sobre los clusters de Au-GSH, podemos señalar que:

- a) El Al(III) no es un ión paramagnético y no produciría, *per se*, un efecto desactivante de la fluorescencia
- b) Las constantes de estabilidad de los complejos de ambos iones con el HPO_4^- son sustancialmente diferentes: la mayor estabilidad del complejo $[\text{FeHPO}_4]^+$ puede dar lugar a una mayor desestabilización de la interacción entre los clusters de Au y el GSH, mientras que en el caso del Al(III) se puede alcanzar una situación de equilibrio a través de la formación de un sistema ternario cluster Au-GSH- $[\text{AlHPO}_4]^+$ fluorescente.

5. Conclusiones

Del trabajo realizado, podemos concluir que:

1. No existe una interacción notable entre el HPO_3^- y las nanopartículas de ZrO_2 al pH estudiado en disolución, no se pueden usar como método analítico
2. Dada la dispersión y la alta irreproducibilidad en los datos obtenidos de los espectros de fluorescencia de las nanopartículas de ZrO_2 inmovilizada se descartan como método de reconocimiento.
3. A los pHs estudiados no parece existir una interacción notable entre los carbon-dots y el HPO_3^- , además los métodos de desactivación son poco selectivos y la intensidad de fluorescencia es baja lo que limita la sensibilidad del método.
4. El uso del sistema Au-GSH-Fe(III) al pH 7,4 es un buen sistema como método de análisis de el HPO_3^- .
5. El cluster Au-GSH-Al(III) tiene un potencial analítico muy interesante para la determinación de HPO_3^- a pH 7,4

6. Sugerencias para estudios posteriores

Los resultados obtenidos en este trabajo han dejado abiertas algunas tareas que pueden ser abordadas en estudios posteriores. A continuación, reseñamos algunas de ellas:

1. Estudios básicos sobre la interacción clusters Au-GSH-Al: naturaleza de la interacción, estabilidad del sistema con el tiempo, caracterización físico-química de los mismos (HR-TEM, MS, SEM, etc)
2. Interacción del sistema Au-GSH-Al con diversas especies de fósforo: estudio a diferentes pHs y caracterización físico-química del sistema. Influencia de otros aniones (p.e. fluoruro).
3. Optimización del sistema Au-GSH-[AlHPO₄]⁺ y aplicación analítica del mismo al análisis de HPO₄⁼ en muestras reales.

7. Bibliografía

- [1] Alejandro Simón de Dios, M.E. Díaz García; Multifunctional nanoparticles: analytical prospects; *Analytica Chimica Acta*, 666 (2010)1-22
- [2] Biosensors: A Practical Approach; J.M. Cooper, J.Cooper, A. E. G. Cass; *Oxford University Press* (2004)
- [3] E.L. Bradley, L.Castle, Q.Chaudhry; Applications of nanomaterials in food packaging with a consideration of opportunities for developing countries; *Trends in Food Science & Technology*, 22 (2011) 604–610
- [4] J. S.Kim, E.Kuk, K.Nam Yu, J.-H. Kim, S. Ji.Park, H. J. Lee, S. H. Kim, Y. Kyung Park, Y.H. Park, Ch.-Y. Hwang, Y.-K.Kim, Y.-Sik Lee, D.H.Jeong, M.-H. Cho; Antimicrobial effects of silver nanoparticles; *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 3 (2007) 95– 101
- [5] Nanotechnology for Environmental Decontamination; Ed. M. Ram, E. S. Andreescu, D.Hanming; *McGraw Hill*, 2011, 1ª Edición, ISBN13: 9780071702799
- [6] Introducción a la Nanotecnología; C.P. Poole Jr., F.J. Owens; *Ed. Reverté*, 2007
- [7] S.M. Reimann, M. Manninen; Electronic structure of quantum dots; *Reviews of Modern Physics*, 74 (2002) 1283-1342
- [8] H.Mattoussi, G.Palui, H.BinNa, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64 (2012) 138–166
- [9] Ayyub, P.; Palkar, V.R.; Chattopadhyay, S.; Multani, M.;Effect of crystal size reduction on lattice symmetry and cooperative properties; *Phys. Rev. B.Condens Matter*; 51 (1995) 6135-6138
- [10]Millot, N.; Aymes, D.; Bernard, F.; Niepce, J.C.; Traverse, A.; Bouree, F.; Cheng, B.L.; Perriat, P.; Particle Size Dependency of Ternary Diagrams at the Nanometer Scale: Evidence of TiO₂ Clusters in Fe-Based Spinel; *J. Phys. Chem. B*, 2003, 107, 5740-5750

Determinación de aniones en aguas de consumo empleando nanopartículas fluorescentes

- [11] R. H. Ritchie, Plasma Losses by Fast Electrons in Thin Films, *Phys. Rev.* 106, (1957) 874-881
- [12] Vicki H. Grassian; When Size Really Matters: Size-Dependent Properties and Surface Chemistry of Metal and Metal Oxide Nanoparticles in Gas and Liquid Phase Environments; *J. Phys. Chem. C*, 112 (2008) 18303–18313
- [13] J. M. Pitarke, V. M. Silkin, E. V. Chulkov, P. M. Echenique; Theory of surface plasmons and surface-plasmonpolaritons; *Rep. Prog. Phys.* 70 (2007) 1–87
- [14] S. N. Baker, G. A. Baker; Luminescent carbon nanodots: emergent nanolights; *Angew. Chem. Int. Ed.* 2010, 49, 6726 – 6744
- [15] Y.-P. Sun, B. Zhou, Y. Lin, W. Wang, K. A. S. Fernando, P. Pathak, M. J. Meziani, B.A. Harruff, X. Wang, H. Wang, P.G. Luo, H. Yang, M. E. Kose, B. Chen, L. M. Veca, S.-Y. Xie; Quantum-Sized Carbon-Dots for Bright and Colorful Photoluminescence; *J. Am. Chem. Soc.*, 128(2006) 7756-7757
- [16] Solubility Data Series, International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), Pergamon Press, *Oxford*, 1979–1992
- [17] Phosphorus in Lawns, Landscapes and Lakes; *An informative guide on Phosphorus*, (2004); *University of Minnesota*.
- [18] <http://swroc.cfans.umn.edu/ResearchandOutreach/SoilManagement/SoilResearch/PhosphorusCycle/index.htm>
- [19] Directiva 91/271/CEE sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas
- [20] Standard Methods, 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. L.S. Clesceri, A.E. Greenberg, A.D. Eaton. *APHA-AWWA-WEF*, Washington DC, USA.
- [21] A.J. Lyddy-Meaney, P.S. Ellis, P.J. Worsfold, E.C.V. Butler, I.D. Mckelvie; A compact flow injection analysis system for surface mapping of phosphate in marine waters. *Talanta* 58 (2002) 1043-1053

Determinación de aniones en aguas de consumo empleando nanopartículas fluorescentes

- [22] J.Z. Zhang; J. Chi; Automated analysis of nanomolar concentrations of phosphate in natural waters with liquid waveguide; *Environ. Sci. Technol.* 36 (2002) 1048-1053.
- [23] J.P.Susanto, M. Oshima, S. Motomizu, H. Mikasa, Y. Hori; Determination of micro amounts of phosphorus with malachite green using a filtration-dissolution preconcentration method and flow injection-spectrophotometric detection. *Analyst* 120 (1995) 187-191.
- [24] L. Zenhai, M. Oshima, A. Sabarudin, S. Motomizu; Trace and ultratrace analysis of purified water samples and hydrogen peroxide solutions for phosphorus by flow-injection method. *Anal. Sci.* 21 (2005) 263-268.
- [25] T. Perez-Ruiz, C. Martinez-Lozano, V. Tomas, J. Martin; Flow-injection spectrofluorimetric determination of dissolved inorganic and organic phosphorus in waters using on-line photo-oxidation. *Anal. Chim. Acta*, 442 (2001) 147-153.
- [26] M. Yaqoob, A. Nabi, P.J. Worsfold; Determination of nanomolar concentration of phosphate in freshwaters using flow injection with luminol chemiluminescence detection. *Anal. Chim. Acta* 510 (2004) 213-218.
- [27] J.Z. Zhang, C.J. Fischer, P.B. Ortner; Optimization of performance and minimization of silicate interference in continuous flow phosphate analysis. *Talanta*, 49 (1999) 293-304.
- [28] H. Zhu, X. Wang, Y. Li, Z. Wang, F. Yang, X. Yang; Microwave synthesis of fluorescent carbon nanoparticles with electrochemiluminescence properties. *Chem. Commun.* (2009) 5118-5120
- [29] P. Li, J. Lin, C. Chen, W. Ciou, P. Chan, L. Luo, H. Hsu, E. W. Diau, Y. Chen; Using gold nanocluster as selective luminescence probes for phosphate-containing metabolites. *Analytical chemistry* 84 (2012) 5484-5488.
- [30] Formación de Complejos en Química Analítica. A. Ringbom; *Ed. Alhambra* (1979)

Determinación de aniones en aguas de consumo empleando nanopartículas fluorescentes

- [31] I. Mitreiter, S. E. Oswald, F. Stallmach; Investigation of Iron(III)-Release in the Pore Water of Natural Sands by NMR Relaxometry. *The Open Magnetic Resonance Journal*, 3 (2010) 46-51
- [32] I. Mitreiter, S.E. Oswald, F. Stallmach; Investigation of Iron(III)-Release in the Pore Water of Natural Sands by NMR Relaxometry; *The Open Magnetic Resonance Journal*, 3(2010) 46-51
- [33] W. Stumm, J.J. Morgan, Aquatic Chemistry: Chemical Equilibria and Rates in Natural Waters, 3^a Edición, *John Wiley & Sons, Inc.*, New York, 1996.
- [34] Principios de Análisis Instrumental. D.A. Skoog, S. R. Crouch, F. J.Holler; *Cengage Learning Editores*; 6^a Ed. (2008)
- [35] J. Bratby, Coagulation and Flocculation in water and wastewater treatment: Treatment with metal coagulants, 2^o Edición, *IWA Publishing*, 131

8. Anexo 1

8.1. Fluorescencia.

La fluorescencia es un fenómeno luminiscente que tiene lugar cuando a un sistema químico ya sea en estado sólido, líquido o gaseoso, simple o complejo, es excitado con una radiación electromagnética y éste se desactiva con una emisión de radiación electromagnética. Para una molécula que se ha excitado por una radiación electromagnética, la fluorescencia se define como la desactivación radiacional desde el nivel vibracional más bajo del primer estado excitado al estado fundamental.

En la Figura 1anx se representa los estados electrónicos fundamental y excitados así como los estados vibracionales y rotacionales de cada nivel electrónico de una molécula.

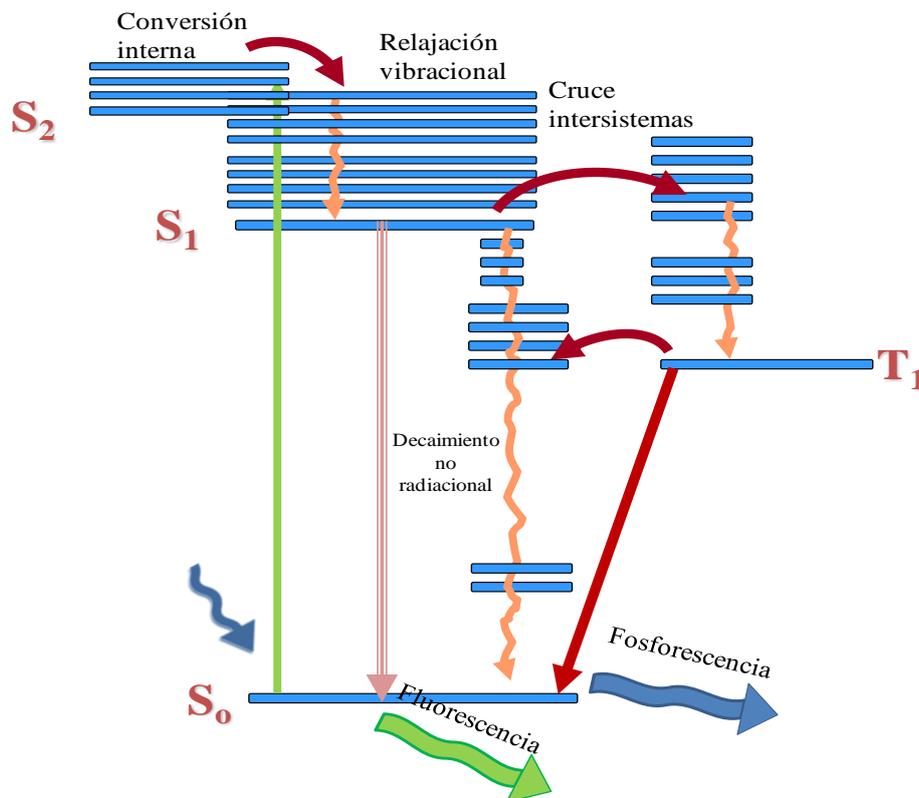


Figura 1anx: Diagrama de Jablonski en el que se muestran procesos que ocurren desde la excitación a la emisión de fluorescencia o fosforescencia.

Determinación de aniones en aguas de consumo empleando nanopartículas fluorescentes

Para que una molécula sea excitada a un estado de energía superior la energía de la radiación incidente debe ser igual a la diferencia de energía, ΔE , entre el estado fundamental (HOMO) y el estado excitado. La expresión que nos da el valor de E para una radiación electromagnética es igual a $E=h\nu$, siendo “h” la constante de Planck y “ ν ” la frecuencia de la onda electromagnética. Esta ecuación se puede expresar también en función de la longitud de onda ya que $\nu=c/\lambda$ siendo “c” la velocidad de la luz y λ la longitud de onda electromagnética. Como podemos ver en el diagrama energético (Figura 1anx) la emisión fluorescente sólo tiene lugar desde el nivel excitado singulete de más baja energía (LUMO). Si la energía de la radiación incidente es suficiente como para excitar a niveles vibracionales superiores al primero se produce la relajación vibracional hasta el estado vibracional más bajo del estado excitado. Puede tener también lugar un cambio de estado energético llamado “conversión interna”, que tiene lugar cuando los estados energéticos están en resonancia; es decir tienen, que sus niveles energéticos solapan.

Existen otras pérdidas energéticas como el cruce intersistemas o la conversión externa. Este hecho da lugar a que la energía de la radiación fluorescente sea menor que la de la radiación de excitación, $E_{excitación} > E_{emisión}$, y por ello, el máximo de fluorescencia aparece a mayores longitudes de onda que la de excitación. Para nanopartículas, el fenómeno fluorescente responde a un fundamento físico diferente aunque el proceso es similar (Figura 2anx):

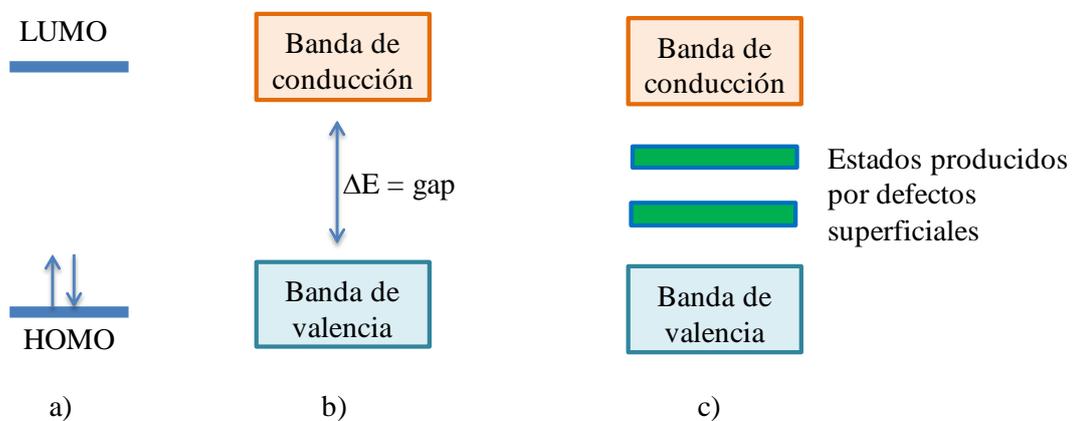


Figura 2anx: Estados electrónicos para a) molécula discreta (b) semiconductor (c) Semiconductor con defectos de superficie.

Determinación de aniones en aguas de consumo empleando nanopartículas fluorescentes

El mecanismo de fotoluminiscencia de los quantum dots es bien conocido. Los quantum dots tienen dimensiones que van desde 1-100nm y muestra una distribución de estados electrónicos (figura 9 (b)) entre la banda de valencia y de conducción existe una diferencia de energía (GAP) el cual depende de la composición, tamaño de la nanopartícula y es la mínima energía necesaria para excitar un electrón desde la banda de valencia a la banda de conducción. El electrón deja un hueco en la banda de valencia el cual al tener signo opuesto interactúa debido a la Fuerza de Coulomb y origina el “exciton” (cuasipartícula par electrón-hueco positivo) la extinción del exciton es conocida como radiación recombinativa y es el responsable de la emisión de fluorescencia.

Para comprender los mecanismos de fluorescencia de las nanopartículas además de las transiciones electrónicas hay que tener en cuenta los efectos de superficie. Estos efectos de superficie son más predominantes en nanopartículas pequeñas (mayor relación Superficie/Volumen). La presencia de estos efectos altera el mecanismo de luminiscencia como se puede ver en la figura 9 (c) la fluorescencia se produce por transiciones que se producen desde las bandas y por el efecto de confinamiento cuántico. Variando además del tamaño la concentración de defectos superficiales también se puede modificar las propiedades ópticas.

Las nanopartículas de carbono pese a no ser semiconductores, tienen un mecanismo parecido explicado por los defectos de superficie y la dependencia del tamaño.