

Sonda fluorescente basada en *carbon dots* sintetizados mediante fotoquímica para la detección de peróxido de hidrógeno y antioxidantes

Carlos Bendicho*, Isabel Costas-Mora, Vanesa Romero, Isela Lavilla

Departamento de Química Analítica y Alimentaria, Área de Química Analítica, Facultad de Química, Universidad de Vigo, Campus de As Lagoas-Marcosende s / n, 36310 Vigo, España

*Correo electrónico: bendicho@uvigo.es

Introducción

Los *Carbon Dots* (CDs) son cada vez más utilizados como nanosondas ópticas fluorescentes, lo que se debe a su estabilidad en disolución, su fácil funcionalización y la baja toxicidad de las mismas [1]. Además, estas nanopartículas (NPs, *nanoparticles*) tienen la ventaja de poder ser sintetizadas a partir de precursores naturales, no tóxicos, como los hidratos de carbono. Hasta el momento se han utilizado distintas vías de síntesis para la obtención de CDs fluorescentes (ej. ablación con láser, descarga por arco, exfoliación electroquímica, tratamiento con microondas, carbonización térmica o deshidratación por ácidos) [1, 2]. La mayoría de estos métodos requieren largos tiempos y altas temperaturas. De ahí, que sea necesario el desarrollo de nuevos métodos de síntesis más sostenibles y rápidos. En este sentido, hasta el momento los distintos estudios llevados a cabo se han centrado en el uso de fuentes de carbono alternativas (sin impacto medioambiental) como precursores de CDs. Algunos ejemplos son: pomelo, cáscaras de sandía y plátano [3-5], pimienta [6] o hojas de bambú [7]. No obstante, el tiempo de reacción y la temperatura necesarios para obtener los CDs fluorescentes siguen siendo elevados.

En general, los ensayos para la detección de diferentes especies químicas basados en el uso de NPs fluorescentes requieren dos etapas: la síntesis de las NPs y el reconocimiento del analito. Esto puede ser simplificado llevando a cabo simultáneamente las dos etapas. Recientemente, nuestro grupo de investigación ha desarrollado una nueva estrategia para la detección de metilmercurio basada en la integración de la síntesis sonoquímica de CDs y la detección en un solo paso [8]. Este procedimiento elimina la necesidad de emplear procedimientos largos y tediosos para purificar y estabilizar los CDs recién sintetizados, acortando enormemente el tiempo necesario para llevar a cabo el ensayo.

El H_2O_2 es un oxidante muy reactivo utilizado a menudo en plantas de tratamiento de agua y en productos para el hogar debido a sus propiedades antimicrobianas. De hecho, su uso es especialmente relevante en los líquidos de limpieza de lentes de contacto para la eliminación de agentes patógenos. Dado que este oxidante puede ser perjudicial para el epitelio ocular y la córnea, su concentración debe ser exhaustivamente controlada [9].

Hasta el momento, la mayoría de los métodos de detección de H_2O_2 utilizan enzimas, lo que plantea algunas limitaciones tales como un alto coste y problemas de estabilidad debidos a cambios en la temperatura, pH y presencia de concomitantes. En los últimos años, se han propuesto diferentes ensayos no enzimáticos para la detección de H_2O_2 en productos para el hogar y líquidos de limpieza de lentes de contacto utilizando materiales nanoestructurados como *nanocomposites* [10], nanopartículas metálicas [11], nanopartículas inorgánicas [12] y puntos cuánticos o *quantum dots* [13]. Hasta el momento, los CDs sólo se han utilizado para detectar H_2O_2 en matrices biológicas [14, 15].

En este trabajo, se propone por vez primera, la síntesis fotoquímica de CDs fluorescentes mediante la aplicación de radiación UV a hidratos de carbono. El aumento o la disminución de la fluorescencia de los CDs por la presencia de H_2O_2 y antioxidantes en el medio de reacción se utiliza como base para la propuesta de un método rápido, de bajo coste y sensible, que integra la síntesis y la detección en una única etapa. El nuevo ensayo se aplicará a la detección de H_2O_2 en líquidos de limpieza de lentes de contacto.

Sección experimental

Reactivos

El agua ultrapura se obtuvo a partir del sistema Ultra Clear TWF EDI UV TM (Siemens AG, Barsbuettel, Alemania). Como fuentes de carbono se utilizaron D-glucosa, D-fructosa, sacarosa, (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE.UU.) y almidón (Probo, Badalona, Barcelona). Como agentes estabilizantes de los CDs se probaron diferentes compuestos: polietilenglicol (PEG, MW = 200), triton X-100, triton X-114, tween 80, polietilenimina (PEI), bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB), dodecil sulfato de sodio (SDS), polivinilpirrolidona (PVP), albúmina de suero bovino (BSA) y L-cisteína, todos ellos adquiridos de Sigma-Aldrich. Como antioxidantes se utilizaron glutatión (GSH) y ácido cítrico de Sigma-Aldrich. El NaOH se obtuvo de Prolabo (París, Francia). En el método comparativo se utilizaron permanganato de potasio (Carlo Erba, Italia) y ácido sulfúrico (Prolabo). Como posibles interferencias se estudiaron: NaCl, tetraborato de sodio, citrato de sodio, carbonato de calcio (Sigma-Aldrich), ácido

etilendiaminotetraacético (EDTA) (Prolabo) y fosfato de sodio (Panreac, Barcelona, España).

Aparatos e instrumentos

Para el tratamiento fotoquímico se utilizó un digestor 705 UV (Metrohm) equipado con una lámpara de mercurio de alta presión (500 W) y un soporte para doce tubos de cuarzo abiertos (15 mm de diámetro interno y 125 mm de altura).

Las medidas de fluorescencia se realizaron con un microfluoroespectrómetro Thermo Scientific NanoDrop 3300. La longitud de onda de excitación fue 470 nm (LED azul) y la de emisión 517 nm. Para el estudio del efecto de la longitud de onda de excitación sobre la longitud de onda de emisión se utilizó con un espectrofluorímetro Shimadzu RF-1501.

Los CDs sintetizados se caracterizaron utilizando distintas técnicas: i) espectrofotometría de absorción molecular UV-vis (las medidas se realizaron en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000); ii) microscopía electrónica de transmisión (TEM, *Transmission Electron Microscopy*) (se utilizó un microscopio JEOL JEM-1010 con voltaje de aceleración de 100 kV); iii) espectroscopía de infrarojos con transformada de Fourier (FT-IR, *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) (las medidas se llevaron a cabo en un espectrómetro Nicolet 6700 dentro de la gama de 400-4000 cm^{-1} con una resolución de 4 cm^{-1}).

Procedimiento

En un tubo de cuarzo se introducen 20 mg de sacarosa y 1,5 mL de la muestra acuosa que contiene el H_2O_2 . Tras la solubilización de la sacarosa, se añaden 0,8 mL de PEG y 200 μL de NaOH 3 M. A continuación, los tubos se introducen en el digestor UV y se irradian durante 1 min. El color de la disolución cambia de incoloro a amarillo claro. Por último, una alícuota de 2 μL de esta disolución se coloca en el pedestal del microfluoroespectrometro con el fin de medir la fluorescencia. Antes de cada medida se lleva a cabo un blanco para calcular la respuesta analítica (I/I_0 , donde I e I_0 representan la intensidad de fluorescencia de los CDs sintetizados en presencia y ausencia de H_2O_2 , respectivamente).

Resultados y discusión

Síntesis fotoquímica de los CDs para la detección de H_2O_2 : estudio de las principales variables

En este trabajo se probaron diferentes hidratos de carbono como precursores de los CDs: D-glucosa, D-fructosa, sacarosa y almidón. Para la selección del medio de reacción se tuvo en cuenta que la fotodegradación de los hidratos de carbono por irradiación UV tienen lugar en medio alcalino [16]. Todos los hidratos de carbono utilizados dieron lugar a CDs fluorescentes, si bien se observaron diferencias en la

cinética de la reacción. Así, los azúcares simples como la glucosa y la fructosa permiten llevar a cabo la síntesis en tiempos de irradiación muy cortos, 45 y 30 s respectivamente. El almidón y la sacarosa requieren un tiempo de irradiación algo mayor (60 s). En el caso del almidón, esto puede atribuirse a la gran cantidad de unidades de glucosa de este polisacárido. Por su parte, la sacarosa es un disacárido compuesto por unidades de glucosa y fructosa, por lo que se requiere mayor energía para romper su estructura y, por lo tanto, un tiempo de irradiación mayor.

Dado que todos los hidratos de carbono utilizados permiten una síntesis rápida de CDs fluorescentes, todos ellos se probaron como nanosondas fluorescentes para la detección de H_2O_2 . En todos los casos se observó un aumento notable en la fluorescencia de los CDs en presencia de H_2O_2 . Además, se obtuvo una respuesta analítica (I/I_0) dependiente de la fuente de carbono y del tiempo de irradiación utilizados (Figura 1). Para glucosa, fructosa y almidón, la respuesta analítica máxima es próxima a 1,5 con tiempos de irradiación muy cortos (de 30 a 90 s). Además, cuando se utiliza sacarosa como precursor de los CDs, la respuesta analítica es mayor ($I/I_0 \sim 2$), utilizando un tiempo de irradiación de 2 min, por lo que ésta fue seleccionada como fuente de carbono para la síntesis de los CDs.

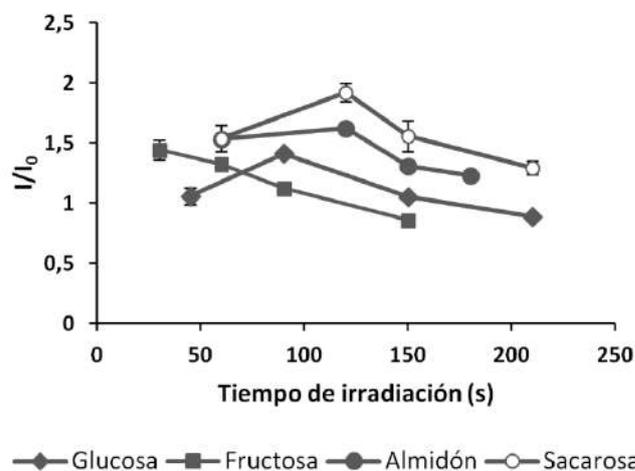


Figura 1. Señal analítica obtenida en presencia de peróxido de hidrógeno utilizando diferentes hidratos de carbono como precursores para la síntesis de los CDs y tiempos de irradiación

El efecto de la masa de sacarosa se estudió en el intervalo de 5 a 60 mg con el fin de alcanzar la máxima sensibilidad para la detección de H_2O_2 . La mejor respuesta analítica se obtiene con una masa de sacarosa entre 20 y 25 mg (Figura 2A). Los anteriores resultados fueron obtenidos en presencia de PEG como agente estabilizante de los CDs. Dado que los agentes estabilizantes pueden influir en las propiedades ópticas de los CDs [17, 18], se estudió el efecto de otras sustancias habitualmente utilizadas como agentes estabilizantes (triton X-100, triton X-114, tween 80, PEI, CTAB, SDS, PVP, BSA, L-cisteína, ácido GSH y ácido cítrico). En comparación con los CDs sintetizados en ausencia de agente estabilizante, sólo PEG, tween 80 y BSA aumentan la

fluorescencia de los CDs sintetizados. No obstante, solamente se obtiene una respuesta analítica adecuada para la detección de H_2O_2 cuando se emplea PEG en el medio de reacción. Por ello, la concentración de este estabilizante fue estudiada (Figura 2B). Como puede observarse, un aumento en la concentración de PEG de hasta 30-40 % (v/v) da lugar a un aumento de la respuesta analítica. En vista a los resultados obtenidos, una concentración de PEG del 35 % (v/v) fue seleccionada para experimentos posteriores.

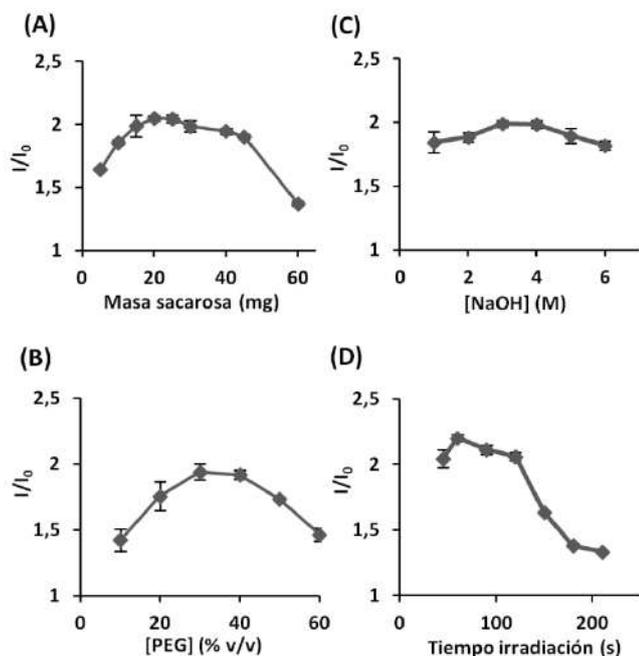


Figura 2. (A) Efecto de la masa de sacarosa (B) Efecto de la concentración de PEG (C) Efecto de la concentración de NaOH (D) Efecto del tiempo de irradiación UV

Tal y como se ha comentado, el pH del medio es un parámetro crítico para obtener CDs fluorescentes [7, 8]. Además, en este caso, es obligatorio utilizar un medio alcalino para que tenga lugar la fotodegradación de los hidratos de carbono [16]. Por esta razón, el efecto de la concentración de NaOH se estudió en el intervalo 1-6 M (Figura 2C). Una concentración de NaOH 3 M fue elegida con el fin de obtener la mejor respuesta analítica.

El tiempo de irradiación se estudió entre 45 y 210 s (Figura 2D). Como puede apreciarse, utilizando tiempos de irradiación cortos la respuesta analítica aumenta. Tiempos de irradiación mayores de 120 s hacen que la señal analítica disminuya. En vista de los resultados obtenidos, se seleccionó un tiempo de 60 s como tiempo óptimo de irradiación. Estas condiciones permiten una detección sensible de H_2O_2 con una elevada frecuencia de muestreo (pueden tratarse 12 muestras simultáneamente en 60 s).

Caracterización de los CDs fotogenerados

De las imágenes TEM obtenidas (Figura 3A) se deduce que los CDs obtenidos por síntesis fotoquímica tienen un tamaño medio de 8 nm y están monodispersos. Además, dado que un factor importante en el tamaño de los CDs es el tiempo de irradiación, se obtuvieron imágenes TEM a 3 y 5 minutos (ambos tiempos mayores de 2 minutos). Así, para 3 y 5 minutos de irradiación se obtuvieron CDs con tamaños promedio de 6 y 3 nm respectivamente, lo que permite concluir que más tiempo de irradiación da como resultado la síntesis de CDs más pequeños.

Los espectros de absorción UV-vis de los CDs fotogenerados muestran una banda centrada a 268 nm (Figura 3B), lo que sugiere que los CDs se forman mediante cambios estructurales de la sacarosa. Es conocido que durante la irradiación UV de los hidratos de carbono en un medio alcalino se produce la fotodegradación de estos y la formación de compuestos que contienen grupos carbonilo, los cuales pueden monitorizarse midiendo la absorbancia a 268 nm [16].

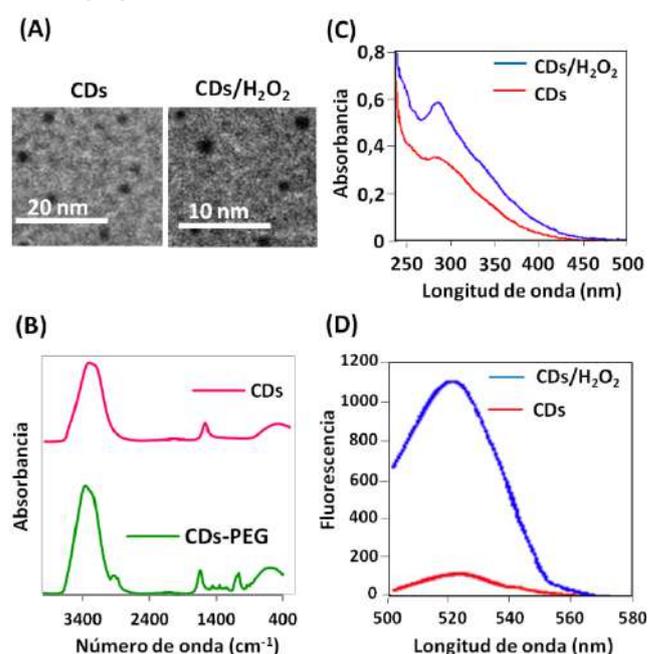


Figura 3. (A) Imágenes TEM de los CDs preparados en ausencia y presencia de H_2O_2 (B) Espectros UV-Vis de los CDs preparados en ausencia y presencia de H_2O_2 (C) Espectros FT-IR de los CDs preparados sin y con PEG (D) Espectros de fluorescencia de los CDs preparados en ausencia y presencia de H_2O_2

La espectroscopia FT-IR se utilizó para el estudio de la composición de la superficie de los CDs. En la Figura 3C se muestran los espectros IR de los CDs (con y sin PEG). La banda a 3350 cm^{-1} corresponde a vibraciones de tensión del grupo OH, mientras que el pico centrado a 2900 cm^{-1} indica la presencia de $sp^3\text{ CH}$ del grupo alcano. Además, tras la irradiación UV se observa la aparición de un nuevo pico a 1640 cm^{-1} , tanto para los CDs sintetizados en presencia como en ausencia de PEG, lo que indica la formación de grupos carbonilo a partir de la sacarosa. Todo ello

demuestra que los CDs fotogenerados están rodeados por grupos hidrófilos que conducen a una elevada solubilidad acuosa.

Cuando la síntesis de los CDs se lleva a cabo en presencia de H_2O_2 , se produce un aumento significativo de la fluorescencia sin que tengan lugar cambios espectrales en la banda de emisión (Figura 3D). Por otro lado, los CDs fotogenerados presentan un color azul bajo irradiación UV (365 nm) que puede apreciarse a simple vista. La emisión de la fluorescencia depende de la longitud de onda de excitación. Así, la banda de emisión de los CDs se desplaza de los 420 a los 520 nm cuando la excitación se lleva a cabo a una longitud de onda entre 300 y 500 nm. Los CDs presentan propiedades de conversión ascendente (*up-conversion*) de la fluorescencia, por lo que la luz de baja energía (NIR o IR) se convierte en luz de más alta energía (rayos UV o visible). Los CDs excitados a una longitud de onda larga (700-900 nm) emiten en el intervalo de 435 a 500 nm, lo que puede deberse a un proceso multifotónico con emisión de tipo anti-Stokes [2].

Ventajas de la síntesis fotoquímica de CDs

La síntesis fotoquímica de los CDs presenta diferentes ventajas con respecto a otros métodos publicados, destacando la rápida velocidad de reacción alcanzada y las condiciones suaves utilizadas (especialmente cabe destacar que la síntesis se lleva a cabo a temperatura ambiente). Por otra parte, la conversión ascendente (*up-conversion*) de la fluorescencia es una propiedad óptica muy atractiva de los CDs preparados, lo que puede resultar prometedor para muchas aplicaciones, especialmente en el campo biológico, debido a la utilización de radiaciones de baja energía como fuentes de excitación en los ensayos fluorescentes [2]. Además, la integración de la síntesis y la detección en una única etapa permite el diseño de ensayos fluorescentes rápidos. Se evitan así las etapas de purificación de los CDs sintetizados, generalmente necesarias en este tipo de ensayos (estas suelen tener una duración de varias horas o días). Por último, destacar la elevada reproducibilidad alcanzada con este tipo de síntesis (las variaciones de la fluorescencia intrínseca de los CDs son de $\pm 2\%$).

Mecanismo de detección del H_2O_2

Para explicar el aumento de la fluorescencia cuando los CDs se sintetizan en presencia de H_2O_2 , se proponen dos posibles mecanismos. Por un lado, cuando se añade H_2O_2 al medio de síntesis, el tamaño de los CDs se reduce dos veces. Como ya se ha comentado, el uso de tiempos de irradiación UV más largos (en ausencia de H_2O_2) también causa una disminución en el tamaño de los CDs como resultado de la foto-oxidación. CDs de tamaños 8, 6 y 3 nm se obtuvieron después de la irradiación UV durante 1, 3 y 5 min respectivamente. Por tanto, los radicales $\bullet OH$ altamente oxidantes formados tras la fotólisis del H_2O_2 podrían acelerar la foto-oxidación de los hidratos de

carbono, obteniendo así CDs más pequeños a tiempos cortos de reacción. La disminución del tamaño de los CDs podría causar un mayor confinamiento cuántico lo que daría lugar a un aumento de la fluorescencia [19, 20].

Por otro lado, los radicales $\bullet OH$ podrían causar el grabado fotoquímico de los CDs-PEG, causando defectos en la superficie que podrían ser responsables del aumento de la fluorescencia observada [2].

Ambos mecanismos se apoyan en los experimentos llevados a cabo con antioxidantes (ácido ascórbico y glutatión). Así, estas sustancias cuando están presentes atrapan los radicales $\bullet OH$ impidiendo la aceleración, tanto de la reacción fotoquímica como del grabado fotoquímico de los CDs.

Características analíticas de la nanosonda fluorescente para la detección de H_2O_2

La variación de la respuesta analítica (I/I_0) con la concentración de H_2O_2 es lineal entre 0,02 y 20 mM, con una ecuación típica $I/I_0 = 591,39 [\text{concentración de } H_2O_2] + 1,0979$ (r^2 0,998). El límite de detección (LOD), calculado siguiendo el criterio de la IUPAC 3σ , fue 5 μM . La repetibilidad, expresada como desviación estándar relativa, fue 3,8 % (n 7) y la reproducibilidad (establecida en tres días consecutivos) fue 6,0 %. Las características analíticas obtenidas son comparables o mejoran las de otros métodos, tanto enzimáticos como no enzimáticos [11, 13, 21, 22].

El intervalo dinámico permite la detección de H_2O_2 en un amplio intervalo de concentraciones en líquidos de limpieza de lentes de contacto (generalmente estos contienen concentraciones inferiores a 0,9 M). Destaca la gran frecuencia de muestreo alcanzada (720 muestras h^{-1}), lo que siempre es conveniente en análisis de rutina. Este método es aproximadamente unas 25 veces más rápido que los publicados hasta el momento para el análisis de líquidos de limpieza de lentes de contacto. Además, cabe mencionar que este ensayo basado en CDs no requiere el uso de enzimas o reactivos caros, lo que reduce considerablemente el coste del análisis.

Posibles interferencias

Diferentes compuestos comúnmente presentes en líquidos de limpieza de lentes de contacto fueron evaluados como posibles interferencias. Para ello se utilizaron disoluciones 1 mM de H_2O_2 . El efecto de una interferencia se consideró significativo cuando la respuesta analítica varía más de $\pm 10\%$. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 1. Citrato de sodio, tetraborato de sodio, AEDT y fosfato de sodio a una concentración mayor que 25, 3, 0,1 y 3,5 % (m/v), respectivamente, dan lugar a una disminución significativa de la señal analítica. Por el contrario, el cloruro de sodio presenta un efecto interferente positivo a una concentración superior a 7 % (m/v). Además, se estudió el efecto del carbonato debido a su elevada capacidad para

eliminar radicales •OH. Concentraciones superiores a 0,3 M dan lugar a una disminución significativa de la señal analítica. A pesar de lo cual, los límites de tolerancia de estas sustancias son más altos que las concentraciones normalmente presentes en los líquidos de limpieza de lentes de contacto.

Tabla 1. Efecto de especies interferentes en la detección de H₂O₂

Interferente	Concentración (% m/v)	Recuperación (%)*
Citrato de sodio	5	101 ± 3,8
	10	103 ± 4,2
	20	107 ± 4,3
	25	110 ± 9,1
Tetraborato de sodio	1	97,1 ± 4,1
	2	95,8 ± 3,1
	3	89,8 ± 3,8
EDTA	0,01	97,6 ± 5,5
	0,05	93,3 ± 3,2
	0,1	89,3 ± 4,2
Fosfato de sodio	1	102 ± 6,0
	3,5	90,0 ± 5,0
	5	86,7 ± 4,8
Cloruro de sodio	1	100 ± 3,9
	2	105 ± 4,6
	5	107 ± 5,0
	7	110 ± 7,8

**Valor medio±desviación estándar (n=3)

Resultados analíticos para la detección de H₂O₂

Con el fin de demostrar la exactitud de la nanosonda fluorescente se realizaron distintos estudios de recuperación. Para ello, se analizaron tres líquidos de limpieza de lentes de contactos diferentes adquiridos en una óptica local. A estos se les añadieron diferentes cantidades de H₂O₂ y se diluyeron 5 veces. Las recuperaciones obtenidas, todas ellas entre 95 y 105 %, se muestran en la Tabla 2.

Además, los resultados obtenidos empleando los CDs como nanosonda fueron comparados con los obtenidos utilizando el método clásico del permanganato de potasio [23]. Los resultados se presentan en la Tabla 2. Estos resultados fueron comparados estadísticamente utilizando la prueba t independiente ($t_{calculada} = 2,42$, $t_{tabulada} = 2,78$ para la muestra 1 y $t_{calculada} = 0,67$, y $t_{tabulada} = 2,78$ para la muestra 2; n 3), confirmando que no hay diferencias significativas entre los resultados obtenidos por los dos métodos para un nivel de confianza del 95%. Estos resultados indican que el método propuesto es adecuado para la detección de H₂O₂ en líquidos de limpieza de lentes de contacto.

Detección de antioxidantes

Dado que la nanosonda responde a un oxidante como el H₂O₂, se estudió su posible utilidad para la detección de antioxidantes. En la actualidad, la determinación de antioxidantes en alimentos ha cobrado un interés especial ya que es fundamental para reducir los efectos de las especies reactivas de oxígeno (ROS, *reactive oxygen species*). Estas han sido relacionadas con el envejecimiento celular y con el crecimiento de tumores cancerígenos.

Para evaluar el potencial de la nanosonda en este caso se utilizaron dos antioxidantes, el ácido ascórbico y el glutatión. Con este fin, se añadieron cantidades conocidas de ácido ascórbico o glutatión a la mezcla de sacarosa / PEG / NaOH / H₂O₂ antes de la irradiación UV. Tanto el ácido ascórbico como el glutatión producen la extinción (*quenching*) de la fluorescencia de los CDs, por lo que se pueden detectar a través de una estrategia de encendido y apagado de la fluorescencia (*turn on-off*). Como ya se ha comentado, esto puede explicarse a partir de la capacidad de los antioxidantes para eliminar los radicales •OH generados durante la fotólisis del H₂O₂. La nanosonda propuesta proporciona un LOD de 6 µM para el ácido ascórbico, que es adecuado para su detección en frutas y productos farmacéuticos. La ecuación de la curva de calibrado fue $I_0/I = 2185,5 \cdot [\text{concentración de ácido ascórbico}] + 0,9960$ con un coeficiente de correlación de 0,993.

Tabla 2. Resultados analíticos para la detección de H₂O₂ en líquidos de limpieza de lentes de contacto.

Muestra	[H ₂ O ₂] encontrado (mM)*			Rec. (%)
	Añadido	Método propuesto**	Método KMnO ₄ **	
1	0	1,84 ± 0,04	1,75 ± 0,09	-
	6,5	8,56 ± 0,12	-	103
	13	14,6 ± 0,17	-	98,3
2	0	1,37 ± 0,09	1,40 ± 0,12	-
	6,5	8,20 ± 0,04	-	105
	13	14,4 ± 0,93	-	100
3	0	<LOQ	-	-
	6,5	6,42 ± 0,03	-	98,7
	13	12,4 ± 0,12	-	95,2

Muestras: (1) Líquido de limpieza de lentes de contacto marca Avizor (Madrid, España); (2) Líquido de limpieza de lentes de contacto marca Solux (Granada, España); (3) Líquido de limpieza de lentes de contacto marca Kümer (Madrid, España). *Diferencia (%) entre las concentraciones de H₂O₂ medidas empleando CDs como nanosonda y el método clásico de permanganato de potasio: Muestra 1 +3,5%; Muestra 2 -2,7% **Valor medio±desviación estándar (n=3)

Conclusiones

En este trabajo, se presenta el potencial de la síntesis fotoquímica de CDs fluorescentes. La integración de la síntesis y la detección (tanto de H₂O₂ como de antioxidantes) permite ampliar el uso de estos CDs a distintas aplicaciones analíticas. El mecanismo implicado en la detección de H₂O₂ fue estudiado mediante

espectrofotometría de absorción molecular UV-vis, fluorescencia molecular, TEM y FT-IR. La disminución del tamaño de los CDs se considera responsable del aumento de la fluorescencia que se produce, lo que a su vez se debe a la aceleración de la reacción fotoquímica por la presencia de radicales •OH. Este proceso puede ser inhibido de una manera eficiente utilizando antioxidantes tales como ácido ascórbico o glutatión, lo que, a su vez, permite la construcción de un sistema de encendido y apagado de la fluorescencia.

En general, la síntesis fotoquímica de los CDs presenta las siguientes ventajas: (i) un tiempo de síntesis y de detección reducido debido a la eficacia de la síntesis fotoquímica y a la integración de los dos procesos; (ii) es una síntesis “verde” en comparación con las vías convencionales, ya que además de la utilización de una energía limpia como la radiación UV hay que considerar las condiciones suaves utilizadas; (iii) los CDs con propiedades de conversión ascendente de la fluorescencia son muy prometedores para futuras aplicaciones biológicas; (iv) un consumo mínimo de muestra y reactivos; (v) una gran frecuencia de muestreo; y (vi) la capacidad de análisis de campo debido a la utilización de un microfluoroscópio portátil.

Agradecimientos

Se agradece la financiación recibida del Ministerio español de Economía y Competitividad (Proyectos CTQ2012-32788 y CTQ2015-68146-P) (MINECO/FEDER).

Referencias

1. S.N. Baker y G.A. Baker, *Angewandte Chemie International Edition* 49 (2010) 6726–6744.
2. J.C.G. Esteves da Silva y H.M.R. Gonçalves, *Trends in Analytical Chemistry* 30 (2011) 1327–1336.
3. W. Lu, X. Qin, S. Liu, G. Chang, Y. Zhang, Y. Luo, A.M. Asiri, A.O. Al-Youbi y X. Sun, *Analytical Chemistry* 84 (2012) 5351–5357.
4. J. Zhou, Z. Sheng, H. Han, M. Zou y C. Li, *Materials Letters* 66 (2012) 222–224.
5. R. Vikneswaran, S. Ramesh y R. Yahya, *Materials Letters* 136 (2014) 179–182.
6. B. Yin, J. Deng, X. Peng, Q. Long, J. Zhao, Q. Lu, Q. Chen, H. Li, H. Tang, Y. Zhang y S. Yao, *Analyst* 138 (2013) 6551–6557.
7. Y. Liu, Y. Zhao y Y. Zhang, *Sensors and Actuators B* 196 (2014) 647–652.
8. I. Costas-Mora, V. Romero, I. Lavilla y C. Bendicho, *Analytical Chemistry* 86 (2014) 4536–4543.
9. R. Hughes y S. Kilvington, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45 (2001) 2038–2043.
10. C. Anjalidevi, V. Dharuman y J.S. Narayanan, *Sensors and Actuators B* 182 (2013), 256–263.
11. N. Jia, B. Huang, L. Chen, L. Tan y S. Yao, *Sensors and Actuators B* 195 (2014) 165–170.
12. S. Thiagarajan, B.-W. Su y S.-M. Chen, *Sensors and Actuators B* 136 (2009) 464–471.
13. S.S.M. Rodrigues, D.S.M. Ribeiro, L. Molina-Garcia, A.R. Medina, J.A.V. Prior y J.L.M. Santos, *Talanta* 122 (2014) 157–165.
14. X. Shan, L. Chai, J. Ma, Z. Qian y J. Chen, H. Feng, *Analyst* 139 (2014) 2322–2325.
15. T.-Y. Yeh, C.-I. Wang y H.-T. Chang, *Talanta* 115 (2013) 718–723.
16. B. Roig y O. Thomas, *Analytica Chimica Acta* 477 (2003) 325–329.
17. M. Algarra, B.B. Campos, K. Radotic, D. Mutavdzic, T. Badosz, J. Jimenez-Jiménez, E. Rodriguez-Castellón y J.C.G. Esteves da Silva, *Journal of Materials Chemistry A* 2 (2014) 8342–8351.
18. X. Teng, C. Ma, C. Ge, M. Yan, J. Yang, Y. Zhang, P.C. Morais y H. Bi, *Journal of Materials Chemistry B* 2 (2014) 4631–4639.
19. K. Linehan y H. Doyle, *Journal of Materials Chemistry* 2 (2014) 6025–6031.
20. 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 B, L.M. Veca y S.J. Xie, *Journal of the American Chemical Society* 128 (2006) 7756–7757.
21. S.S.M.P. Vidigal, I.V. Tóth, A.O.S.S. Rangel, *Microchemical Journal* 91 (2009) 197–201.
22. J.P.N. Ribeiro, M.A. Segundo, S. Reis, J.L.F.C. Lima, *Talanta* 79 (2009) 1169–1176.
23. Council of Europe, *European Pharmacopoeia*, 5th Ed., 2004.