



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Facultat de Química

Departament de Química Inorgànica

“Diseño, síntesis y caracterización de sistemas híbridos. Aplicaciones médicas y medioambientales.”

Memoria presentada en la Facultad de Química de la
Universidad de Valencia para optar al título de Doctor en
Química por:

Estefanía Delgado Pinar

Directores

Dr. D. Enrique García-España Monsonís

Dr. D. Javier Alarcón Navarro

D. Enrique García-España Monsonís, Catedrático del Departamento de Química Inorgánica de la Universidad de Valencia y **D. Javier Alarcón Navarro**, Catedrático del Departamento de Química Inorgánica de la Universidad de Valencia,

CERTIFICAN:

Que la presente Memoria, titulada **“Diseño, síntesis y caracterización de sistemas híbridos. Aplicaciones médicas y medioambientales.”**, ha sido realizada bajo su dirección conjuntamente en el Departamento de Química Inorgánica de la Universidad de Valencia, por la Licenciada **D^a. Estefanía Delgado Pinar**, y que, encontrándose concluida, autorizan su presentación para ser calificada como Tesis Doctoral.

Y para que así conste, expiden y firman el presente informe y la memoria ante la Facultad de Química.

Paterna, 7 de Octubre de 2015.

D. Enrique García-España Monsonís

D. Javier Alarcón Navarro

En primer lugar deseo expresar mi agradecimiento a mis directores de tesis, el prof. Enrique García-España Monsonís y el prof. Javier Alarcón Navarro por haberme dado la oportunidad de trabajar con ellos. Gracias por el tiempo que me han dedicado todos estos años, por sus buenos consejos y por todo lo que me han enseñado.

A la prof. Concepción Soriano, que aunque no es mi directora de tesis, siempre ha estado dispuesta a ayudar con la síntesis y con el día a día en el laboratorio.

A todos mis compañeros de grupo con los que he tenido la suerte de coincidir durante todos estos años, porque me han enseñado mucho, de ciencia y de la vida. He conseguido hacer muy buenos amigos dentro de “supramol” que sé que durarán por mucho tiempo o así lo espero. Porque los momentos compartidos han significado mucho para mí.

A todos los amigos que he conocido gracias a la realización de esta tesis: en los cursos de doctorado, en el café de sobremesa, en administración, y en las estancias realizadas, porque siempre me habéis dejado ver otros puntos de vista que me han permitido avanzar como persona.

Al prof. Fernando Pina y a su grupo por acogerme en Lisboa, fue corto pero aprendí que la fluorescencia me gusta.

Al prof. Jean-Marie Lehn y a su grupo en Estrasburgo, porque durante el tiempo que pasé con ellos se fue afianzando mi idea de continuar en “esto” de la investigación.

Al SCSIE de la Universidad de Valencia, en especial, a Isabel del servicio de RMN y Sales del servicio de masas por su paciencia y por ayudarme cuando las muestras eran un “poco” complicadas.

A todos mis amigos que no pertenecen a este mundillo que durante estos años han estado siempre ahí apoyándome, aunque no supiesen muy bien a qué me dedicaba.

Me gustaría agradecer enormemente a mis padres, a mi hermana y a toda mi familia el apoyo incondicional que me han brindado todo este tiempo. Porque ellos han estado en los buenos, pero también en los malos momentos. Sé que sin su paciencia y comprensión no hubiese podido llegar hasta aquí.

Por último, quiero que todos los que han compartido conmigo alguna de las ilusiones que me motivaron durante estos años, se sientan partícipes de este trabajo.

A todos, gracias.

El trabajo recogido en esta Tesis ha sido financiado por el proyecto Ingenio 2010 Consolidar, programa Prometeo 2011/008 y los fondos FEDER. Agradezco al Ministerio de Educación, Cultura y Deporte por el disfrute de la beca predoctoral para la Formación de Profesorado Universitario (FPU).

Índice	I
Abreviaturas y acrónimos.	XI
CAPÍTULO 1. Introducción.	1
1.1. Química Supramolecular	3
1.1.1. Reconocimiento Molecular.	5
1.1.2. Catálisis.	8
1.1.3. Transporte.	9
1.1.4 Diseño de Receptores Moleculares.	10
1.2. Luminiscencia.	16
1.2.1. Tipos de transiciones electrónicas en moléculas poliatómicas.	19
1.2.2. Características de la emisión de fluorescencia.	22
1.3. Sensores ópticos.	37
1.3.1 Sensores moleculares ópticos.	37
1.3.1.1. Desactivación por colisión.	39
1.3.1.2. Sondas intrínsecas.	40
1.3.1.2.1. Sondas intrínsecas fluorescentes.	41
1.3.1.2.2. Sondas intrínsecas cromogénicas.	41
1.3.1.3. Sondas extrínsecas.	42

1.3.1.4. Ensayos competitivos o de desplazamiento.	44
1.3.1.4.1. Ensayos de desplazamiento fluorescentes.	45
1.3.1.4.2. Ensayos de desplazamiento cromogénicos.	46
1.3.1.5. Dosímetro químico.	47
1.3.1.5.1. Dosímetro fluorogénico.	48
1.3.1.5.2. Dosímetro cromogénico.	48
1.3.2. Sensores moleculares fluorogénicos.	49
1.3.2.1. Por transferencia electrónica fotoinducida y transferencia electrónica.	50
1.3.2.2. Por transferencia de carga fotoinducida.	53
1.3.2.3. Por formación/desaparición de excímeros.	58
1.4. Sensores ópticos basados en materiales nanoestructurados.	62
1.4.1. Nanopartículas utilizadas en bioimagen y detección.	64
1.4.1.1. Quantum dots.	66
1.4.1.2. Nanopartículas de oro.	68
1.4.1.3. Nanotubos de carbono.	71
1.4.1.4. Monocapas autoensambladas sobre superficies de vidrio.	73
1.4.1.5. Óxidos Inorgánicos.	73

1.4.1.5.1. Quimiosensor en la superficie.	75
1.4.1.5.2. Unidad fluorófora y receptora separadas en la superficie.	78
1.4.1.5.3. Unidad fluorófora en el interior y receptora en la superficie.	80
1.4.1.5.4. Quimiosensor en el interior de la nanopartícula.	82
1.4.1.6. Nanopartículas con estructura núcleo-envoltura de sílice.	83
1.5. Motivación de la presente tesis doctoral.	85
1.6. Bibliografía.	86
CAPÍTULO 2. Características estructurales y microestructurales de la bohemita.	97
2.1. Introducción.	99
2.2. Síntesis de materiales oxídicos.	99
2.3. Bohemita.	102
2.3.1. Estructura cristalina.	105
2.3.2. Síntesis.	109

2.3.3. Ventajas del uso de bohemita como sistema nanoestructurado.	112
2.4. Bibliografía.	115
CAPÍTULO 3. Objetivos.	121
CAPÍTULO 4. Material and methods.	127
4. 1. Nuclear magnetic resonance measurements.	129
4. 2. Melting point.	130
4. 3. C, H, N analysis.	130
4. 4. Spectrometric measurements.	130
4. 5. Powder X-ray diffraction.	130
4.6. Infrared transmission spectra.	131
4.7. Transmission electron microscopy.	131
4.8. Energy dispersive X-ray.	132
4.9. Thermal analysis.	132
4.10. Potentiometric measurements.	133
4.11. Steady-state fluorescence.	134
4 12. Time-resolved measurements.	134
4.13. Laser flash photolysis.	135

4.14. Quantum yield.	135
4.15. Detection limit.	135
4.16. Ultraviolet-visible measurements.	136
4.17. Measurement of q value.	137
4.18. Magnetic resonance imaging.	138
4.19. Nuclear magnetic relaxation dispersion.	139
4.20. Variable temperature ^{17}O NMR transverse (T_2) relaxation time.	139
4.21. Laser confocal microscopy.	139
4.22. Flow cytometry analysis.	140
4.23. References.	141
CAPÍTULO 5. Synthesis and characterization.	143
5.1. Synthesis of nanoparticles.	145
5.1.1. Sol-gel procedure.	145
5.1.2. Synthesis of boehmite nanoparticles.	146
5.1.2.1. Experimental procedure.	146
5.1.2.2. Characterization.	147
5.1.3. Synthesis of boehmite-silica core-shell nanoparticles.	151

5.1.3.1. Experimental procedure.	152
5.1.3.2. Characterization.	152
5.2. Synthesis of inorganic-organic systems.	158
5.2.1. General procedure for nanoparticles surface functionalization.	158
5.2.2. Synthesis of anthracene core-shell hybrid systems.	159
5.2.3. Synthesis of contrast agents hybrid systems.	161
5.2.4. Synthesis of squaramide hybrid systems.	165
5.2.5. Synthesis of pyrene hybrid systems.	168
5.2.6. General characterization for hybrid systems.	173
5.3. References.	175

CAPÍTULO 6. Nanopartículas de bohemita modificadas

para la detección de Hg(II) en agua. 177

6.1. Introducción.	179
6.2. Poliaminas como quimiosensores metálicos.	182
6.3. Sistemas híbridos empleados.	184
6.4. Estudios fluorimétricos.	187
6.4.1. Comportamiento ácido - base en disolución acuosa.	188

6.4.2. Química de coordinación catiónica.	192
6.4.3. Cálculo del límite de detección.	198
6.5. Conclusiones.	200
6.6. Bibliografía.	201
CAPÍTULO 7. Nanopartículas de bohemita modificadas con complejos de Ln³⁺: propiedades ópticas y empleo como agentes de contraste.	205
7.1. Introducción.	207
7.1.1. Resonancia magnética de imagen.	207
7.1.2. Agentes de contraste basados en complejos de Gd(III).	211
7.1.3. Lantánidos.	215
7.1.3.1. Emisión del europio y del terbio.	216
7.2. Sistemas híbridos empleados como agentes de contraste y sondas luminiscentes.	219
7.2.1. Caracterización de los complejos con Eu(III), Tb(III) y Gd(III).	222
7.2.2. Caracterización del sistema B-Gd(III)-DO3A y B-Gd(III)-DTPA como agentes de contraste.	228
7.2.2.1. Cálculo de q .	228

7.2.2.2. Imágenes de resonancia magnética y cálculo de la relajatividad.	231
7.2.2.3. Perfiles de relajación magnética nuclear.	233
7.2.2.4. Tiempos de relajación transversal mediante ¹⁷ O RMN.	236
7.2.3. Caracterización de los complejos de Eu(III) y Tb(III) como sondas luminiscentes.	238
7.2.3.1. Microscopía confocal de imagen.	238
7.2.3.2. Citometría de flujo.	241
7.3. Conclusiones.	244
7.4. Bibliografía.	245

CAPÍTULO 8. Nanopartículas de bohemita modificadas

para la detección de sulfato en agua.	249
8.1. Introducción.	251
8.1.1. Reconocimiento de sulfato.	254
8.1.2. Unidades escuaramida para el reconocimiento aniónico.	257
8.2. Receptores híbridos.	260
8.3. Selección del indicador cromogénico.	261

8.4. Interacción de los materiales híbridos con el indicador verde de bromocresol.	263
8.5. Experimentos de competición y determinación de las constantes de asociación.	270
8.6. Evolución de los sistemas híbridos.	276
8.7. Conclusiones.	282
8.8. Bibliografía.	284

CAPÍTULO 9. Nanopartículas de bohemita modificadas para la detección de yoduro en agua. 287

9.1. Introducción.	289
9.2. Detección de haluros mediante la espectroscopía de fluorescencia.	290
9.3. Sistemas empleados.	292
9.3.1. Comportamiento ácido-base.	294
9.3.1.1. Determinación de las constantes de protonación.	294
9.3.1.2. Determinación de las secuencias de protonación.	296
9.4. Estudios fluorimétricos.	301
9.4.1. Comportamiento ácido - base en disolución acuosa.	304

9.4.2. Medida de los principales parámetros fotoquímicos.	311
9.5. Reconocimiento aniónico.	317
9.5.1. Cálculo del límite de detección.	331
9.6. Conclusiones.	332
9.7. Bibliografía	333
CAPÍTULO 10. Summary and conclusions.	337
APÉNDICE A. Espectros de RMN.	347
APÉNDICE B. Publicaciones.	355

J. L. Bourdelande, S. Nonell, A. U. Acuña y R. Sastre, *Glosario de términos usados en fotoquímica*, 2ª edición, 1996.

B. Méndez, J. C. Méndez, *Glosario español-inglés de imágenes de resonancia magnética*, Panace@ 2007, 8 (26), 103.

k_r^s	Constante de velocidad del proceso de desactivación radiativa
k_{nr}^s	Constante de velocidad del proceso de desactivación no radiativa
λ	Longitud de onda
τ	Tiempo de vida media
ε	Coefficiente de extinción molar
Ψ	Función de onda electrónica
τ_M	Tiempo de vida media que las moléculas de agua permanecen en la esfera de coordinación interna coordinadas al centro metálico
τ_R	Tiempo de vida media de rotación molecular del complejo de Gd(III)
1,2,3-BTC	ácidos 1,2,3-benceno tricarboxílico
1,2,4-BTC	ácidos 1,2,4-benceno tricarboxílico
A	Molécula en el estado fundamental
A	Anión (capítulo 9)
A*	Molécula en el estado excitado
Abs	Absorbancia
AuNPs	Nanopartículas de oro
CA	Agente de contraste (contrast agent)

CIT	Ácido cítrico
CNTs	Nanotubos de carbono
CP	Polímeros conjugados
CT	Transferencia de carga (charge transfer)
CT	Tomografía computerizada de rayos X (X-ray computer tomography)
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CHEF	Aumento de la intensidad de emisión (chelation enhancement of fluorescence)
CHEQ	Desactivación de la intensidad de fluorescencia (chelation enhancement of quenching)
d	Doblete
DOTA	1,4,7,10-Tetrazaciclododecanotetraacético
DTPA	Ácido dietilentriaminopentaacético
E	Energía de un fotón
EDX	Dispersión de energías de rayos X (energy-dispersive X-ray)
EET	Transferencia de energía electrónica (electron energy transfer)
EPA	agencia de protección medioambiental
ET	Transferencia electrónica (electron transfer)
EtOH	Etanol
eV	Electronvoltio
FRET	Transferencia de energía de resonancia de Förster (Förster resonance energy transfer)

h	Constante de Planck
$h\nu$	Energía de un fotón
H ₂ O	Agua
HOMO	Orbital molecular ocupado de más alta energía (Highest Occupied Molecular Orbital)
HSQC	Correlación de RMN ¹ H- ¹³ C (Heteronuclear Simple Quantum Correlation)
Hz	Hercio
I	Intensidad de fluorescencia
IC	Conversión interna (internal conversion)
ICP-MS	Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (inductively coupled plasma mass spectrometry)
ICT	Transferencia interna de carga (Internal charge transfer)
ISC	Cruce intersistema (intersystem crossing)
J	Constante de acoplamiento
K _S	Constante de asociación
K _{sv}	Constante de Stern-Volmer
LD o DL	Límite de detección o detection limit
LD ₅₀	Dosis letal (lethal dosis)
LFP	Fotólisis <i>flash</i> (laser flash photolysis)
LUMO	Orbital molecular vacío de menor energía(Lowest Unoccupied Molecular Orbital)
m	Multiplete

Abreviaturas y acrónimos.

mal	Ácido maleico
malo	Ácido malónico
mL	Mililitros
MRI	Resonancia magnética de imagen (magnetic resonance imaging)
nm	Nanómetros
NMRD	Dispersión de relajación magnética nuclear (nuclear magnetic relaxation dispersion)
°C	Grados celsius
PCT	Transferencia de carga fotoinducida (photoinduced charge transfer)
PET	Photoinduced electron transfer (transferencia electrónica fotoinducida)
PET	Tomografía por emisión de positrones (positron emission tomography)
P_m	Fracción molar moléculas de agua coordinada en el complejo de Gd(III)
ppb	Partes por billón
ppm	Partes por millón
PZC	Punto de carga cero
Q	Molécula desactivadora de la fluorescencia (Quencher)
q	Número de moléculas de agua presentes en la esfera interna que se encuentran directamente coordinadas al
QDs	Quantum dots
Quenching	Proceso de desactivación bimolecular
r	Relajatividad (relaxivity)

R_1	Velocidad de relajación longitudinal
R_d	Velocidad de relajación diamagnética
RF	Radiofrecuencia (radio frequency)
R_t	Velocidad paramagnética
s	Singlete
SAMs	Monocapas autoensambladas
SBM	Teoría de Solomon-Bloembergen-Morgan
SCSIE	Servicio central de soporte a la investigación experimental (central service for experimental research)
SNR	Relación señal-ruido (signal to noise ratio)
SPB	Banda de plasmón de superficie
SPECT	Tomografía computerizada de emisión monofotónica (single-photon emission computed tomography)
T_1	Tiempo de relajación longitudinal
T_{1e}	Tiempo de relajación longitudinal de spin del ión metálico
T_2	Tiempos de relajación transversal
T_2	Tiempo de relajación transversal experimental del complejo de Gd(III)
T_{2r}	Tiempo de relajación transversal experimental de la disolución de referencia
TEM	Microscopía electrónica de transmisión (Transmission electronic microscopy)
TGA	Análisis termogravimétrico (thermogravimetric analysis)

Abreviaturas y acrónimos.

TICT	Transferencia interna de carga con torsión (Twisted internal charge transfer)
u.a.	Unidades arbitrarias
UV	Universidad de valencia
UV-vis	Ultravioleta-visible
ν	Frecuencia de la onda electromagnética asociada al fotón
VB	Verde de bromocresol
VR	Relajación vibracional (vibrational relaxation)
XRD	Difracción de rayos X (powder X-ray diffraction)
Φ	Rendimiento cuántico

1.



Introducción.

1.1. Química Supramolecular.

En 1987, el premio Nobel de Química J. Marie Lehn definió la *química supramolecular* como la química del enlace intermolecular, que engloba la estructura y las funciones de entidades formadas por la asociación de dos o más especies químicas.¹ Se puede definir la *química molecular* como la química del enlace covalente, que se centra en descubrir y dominar las reglas que controlan las estructuras, sus propiedades y las transformaciones que pueden experimentar estas especies moleculares. A partir de la química molecular, surge la química supramolecular como *la química más allá de la molécula*, orientada hacia entidades organizadas con un elevado grado de complejidad que resultan de la asociación de dos o más especies químicas unidas a través de enlaces no covalentes. Estas nuevas entidades supramoleculares exhiben propiedades tan bien definidas como las de las moléculas que las integran por sí mismas junto con otras totalmente nuevas (figura 1.1)^{2, 3}

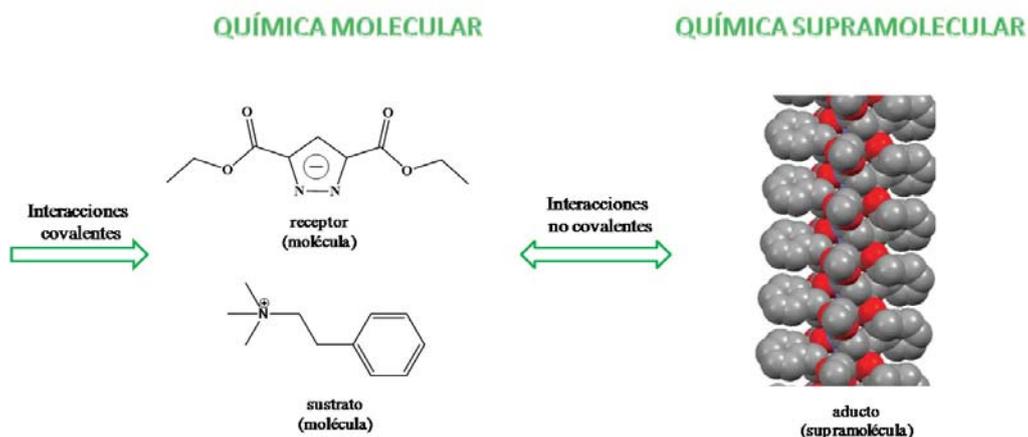


Figura 1.1. Formación de hetero-hélices dobles mediante enlaces de hidrógeno entre el ester del 1H-pirazol-3,5-dicarboxilato y la feniletilamina.³

En una entidad supramolecular se puede distinguir dos especies denominadas receptor y sustrato, siendo normalmente el sustrato el

componente de menor tamaño. Esta terminología surge por analogía con el concepto de receptor y sustrato biológico desarrollado por Paul Ehrlich.

Las interacciones moleculares son de gran importancia ya que forman la base de procesos de elevada eficacia y selectividad como el reconocimiento, la catálisis, el transporte, la regulación, etc. y que ocurren en la mayor parte de procesos biológicos, como por ejemplo la unión de un sustrato a un receptor proteico, una reacción enzimática, la asociación inmunológica antígeno-anticuerpo o la transcripción del código genético. A la hora de diseñar moléculas receptoras abióticas artificiales capaces de mimetizar estos procesos es necesario manipular correctamente las características energéticas y estereoquímicas de las fuerzas no covalentes intermoleculares (enlaces de hidrógeno, fuerzas hidrófobas, de Van der Waals, interacciones π , etc.) dentro de una arquitectura molecular definida.

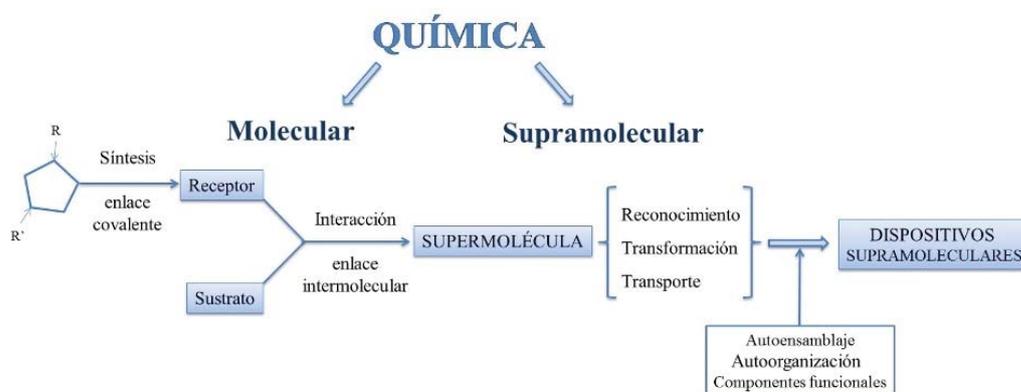


Figura 1.2. Evolución de la química molecular hacia la química supramolecular.⁴

Cuando se produce la unión de un sustrato por parte de un receptor se forma la supermolécula receptor-sustrato. Si la interacción que tiene lugar es selectiva y discrimina un sustrato frente a otros, se puede decir que la supermolécula lleva a cabo un **reconocimiento**. Si, además de los puntos de unión, el receptor exhibe funciones reactivas puede provocar una

transformación química sobre el sustrato que se ha unido previamente, comportándose como un reactivo supramolecular o **catalizador**. En el caso de que el receptor tenga las características adecuadas de lipofilia, capacidad de interacción, cinética, estabilidad, etc., puede actuar como **transportador** del sustrato a través de membrana. Todas estas posibilidades hacen que tanto el reconocimiento molecular, como la transformación o catálisis y el transporte sean las funciones básicas de las especies supramoleculares. Se pueden dar funciones más complejas, cuando entran en juego varias subunidades capaces de formar uniones en un coreceptor politópico, formándose ensamblajes y dando lugar a diferentes tipos de asociaciones (capas, membranas, vesículas, cristales líquidos, etc.). Esta última posibilidad de autoensamblaje, junto con las anteriores componen los 4 pilares básicos para el desarrollo de los dispositivos moleculares (figura 1.2).¹

1.1.1. Reconocimiento Molecular.

Como se ha comentado anteriormente, el concepto de reconocimiento surgió de la mano de Emil Fischer cuando acuñó el concepto de llave-cerradura para explicar el proceso de reconocimiento enzimático.⁵ En él, se compara el centro activo de una enzima (con una estructura fija) con una cerradura, y una molécula de sustrato cuya estructura encaja perfectamente en la del enzima se compara con una llave. Ambas moléculas poseen complementariedad geométrica, es decir, el reconocimiento tiene lugar únicamente cuando “las piezas” encajan perfectamente una en la otra como se puede ver en la figura 1.3.

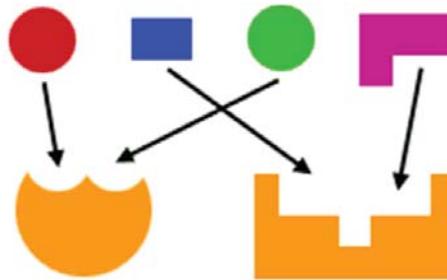


Figura 1.3. Modelo “llave-cerradura”, destacando la complementariedad topológica necesaria en el reconocimiento molecular.

Unos años después D. Koshland sugirió algunas modificaciones a este modelo ya que a partir de los estudios realizados se llegó a la conclusión que las enzimas son estructuras flexibles, que pueden cambiar la conformación estructural de su centro activo al producirse la interacción con el sustrato, formando un complejo enzima-sustrato. Una vez se ha producido el reconocimiento, el sustrato es transformado en uno o varios productos nuevos de forma que pierde su estructura original y, por tanto, termina siendo liberada del punto de unión o anclaje, dejando a su vez libre a la enzima. Este modelo se conoció como el modelo de encaje inducido (figura 1.4).⁶

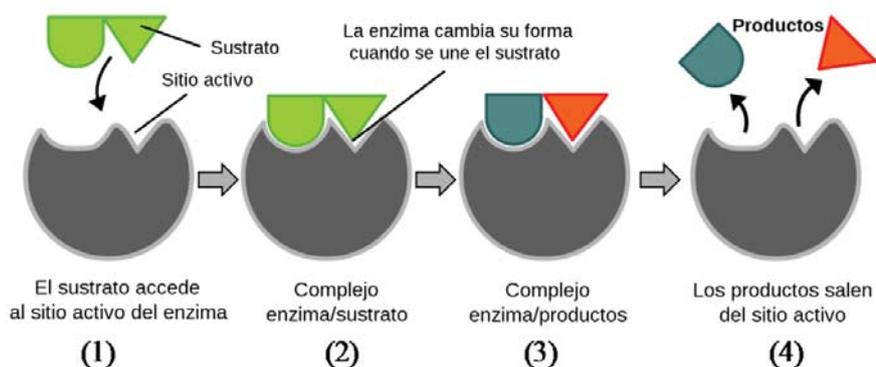


Figura 1.4. Modelo de encaje inducido: (1) Reconocimiento del sustrato. (2) El receptor cambia ligeramente de forma cuando entra el sustrato en el centro activo, haciendo más preciso el proceso de ajuste. (3) Catálisis enzimática y (4) Liberación de productos.

Por tanto, el proceso de reconocimiento, ya sea entre una enzima y un sustrato, o entre otras dos especies cuya asociación no suponga una reacción enzimática, no se puede explicar únicamente mediante un acoplamiento estérico, sino que entran en juego las interacciones intermoleculares de tipo no covalente, que son la base de multitud de procesos específicos como el ensamblaje de complejos multiproteicos, la transcripción del código genético, la entrada de virus a las células, la inducción de la señal por neurotransmisores, etc.⁷

Tabla 1.1. Fuerza de diferentes interacciones o enlaces más comunes.⁸

Tipo de interacción o enlace	Fuerza (kJ·mol ⁻¹)
Enlace covalente	100-400
Coulomb	100-350
Enlace de hidrógeno	4-120
Ión-dipolo	50-200
Catión- π	5-80
π - π	0-50
Fuerzas de Van der Waals	< 5
Efectos hidrofóbicos	Difícil de asignar
Metal-ligando	0-400
Enlace de coordinación	100-300

Debido a la importancia de estas interacciones se ha producido un estudio exhaustivo de las mismas centrándose en las diferencias que presentan tanto en su fuerza como en su naturaleza. En términos energéticos, las interacciones no covalentes son generalmente varios órdenes de magnitud más débiles que los enlaces covalentes; así, estos

enlaces no covalentes van desde los enlaces coordinativos con una fuerza de varios cientos de $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ a las interacciones débiles de van der Waals que representan sólo unos pocos $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, tal como se puede ver en la tabla 1.1.

1.1.2. Catálisis.

Dentro de la química supramolecular, una de las funciones que puede desarrollar la supermolécula es la capacidad de transformar químicamente un sustrato. Si las moléculas que actúan como receptor tienen grupos funcionales apropiados junto con puntos de unión específicos, serán capaces de formar un complejo con el sustrato, reaccionar con él y liberar especies químicamente diferentes, recuperando la molécula que actúa como receptor para un futuro. Para llevar a cabo estas transformaciones se pueden distinguir dos etapas principales. En la primera de ellas se produce un proceso de unión con el sustrato, y a continuación, en la segunda etapa, se lleva a cabo la transformación del mismo en los productos. En ambas etapas participan los principios asociados al reconocimiento molecular, ya que el receptor debe tener las características topológicas y funcionales adecuadas para complejar al sustrato y liberar a los productos.

El diseño de estos sistemas se puede llevar a cabo desde diferentes aproximaciones (figura 1.5):⁹ en la primera de ellas (A) el receptor consta de un punto de unión situado cerca del centro catalítico. En la segunda aproximación (B) el receptor induce la reacción química sobre más de un sustrato complejoado a él de manera simultánea, formando un complejo

multimolecular, y por último (C) existe la posibilidad de utilizar la química supramolecular para construir el propio centro catalítico.

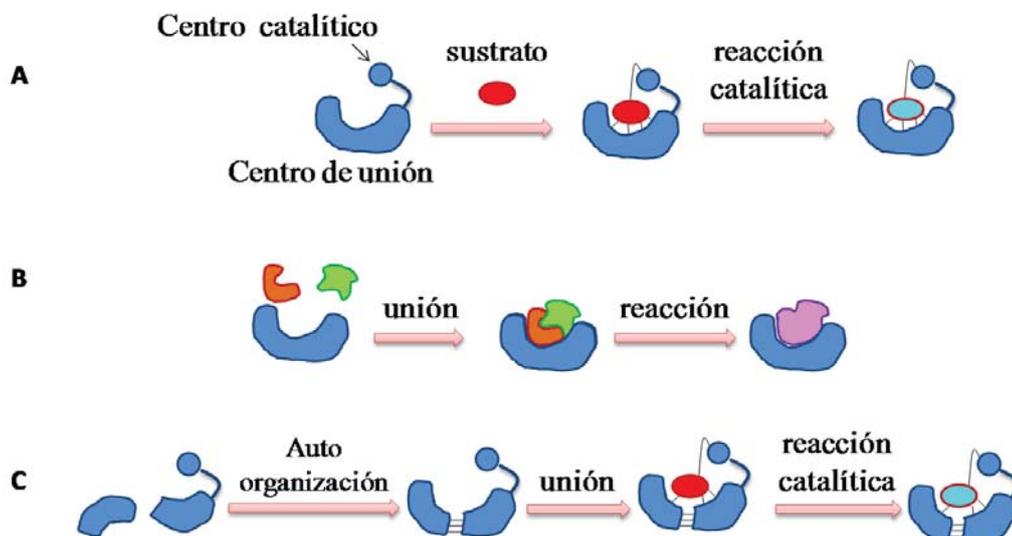


Figura 1.5. Aplicación de la química supramolecular a la catálisis.⁷

1.1.3. Transporte.

El transporte de sustratos orgánicos e inorgánicos representa una de las funciones características de las especies supramoleculares junto con el reconocimiento y la catálisis. El diseño y la síntesis de moléculas capaces de reconocer selectivamente a un sustrato y llevarlo a través de una barrera impermeable a dicho sustrato es un fenómeno fundamental en muchos procesos biológicos.

Principalmente, existen dos estrategias básicas para que se produzca el fenómeno del transporte. En la figura 1.6a se muestra un esquema del transporte a través de membrana inducido por moléculas transportadoras, mientras que en la figura 1.6b se produce gracias a la existencia de canales transmembrana.

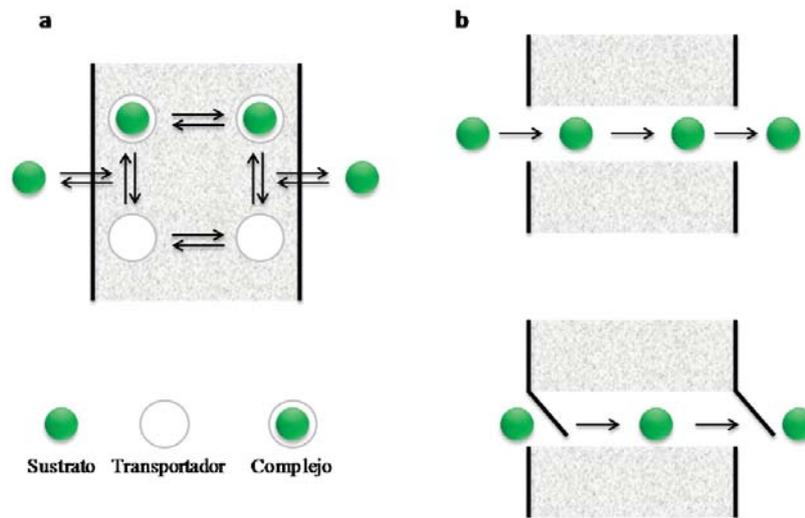


Figura 1.6. Procesos de transporte: mediante moléculas transportadoras (6a), canales (6b arriba) y canales con puerta (6b abajo).

En ambos casos, el fundamento es el mismo: el sustrato no puede pasar a través de la membrana por sí mismo, pero la asociación o supermolécula que forma con el receptor sí que puede, entendiendo que el receptor es la molécula transportadora en el primer caso y el canal en el segundo. Si el proceso es mediante un ionóforo el proceso global consiste en un ciclo con cuatro etapas: i) Se produce el reconocimiento entre el sustrato y el transportador; ii) El complejo formado es difundido a través de la membrana; iii) Se produce la disociación del complejo; y iv) El transportador se retrodifunde a su posición original.

1.1.4. Diseño de Receptores Moleculares.

De manera general, se puede considerar que la química que rodea a las moléculas receptoras artificiales es una química de coordinación, que no se limita a los metales de transición, sino que por el contrario abarca todo tipo de sustratos: especies catiónicas, aniónicas o neutras de

naturaleza orgánica, inorgánica o biológica. Para conseguir la mayor selectividad hacia un sustrato determinado, el receptor debe ser capaz de organizar todos sus puntos de unión de manera complementaria a las características estructurales del sustrato. Por ello, a la hora de diseñar un receptor para un sustrato, existen dos puntos de partida, representados en la figura 1.7, que se basan principalmente en el grado de adaptabilidad o rigidez de la estructura del receptor.

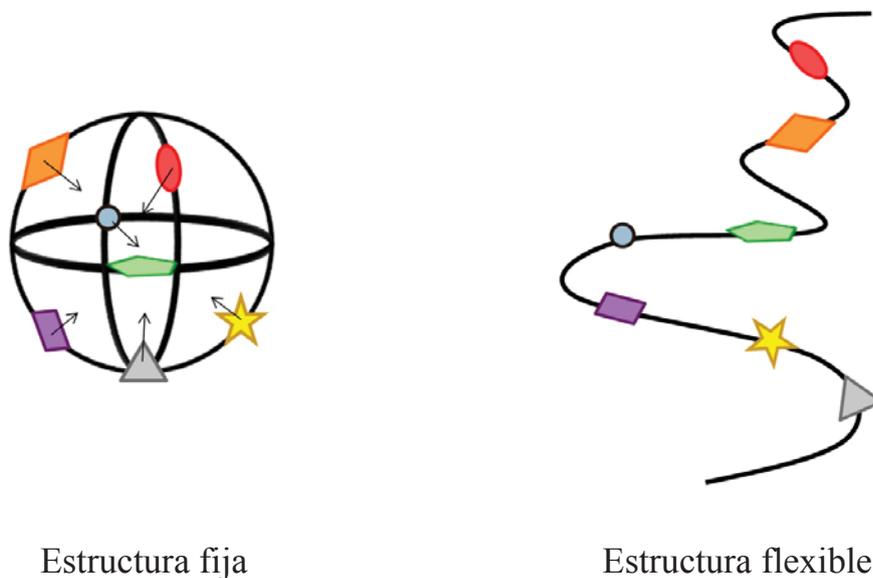


Figura 1.7. Conceptos opuestos en el diseño de receptores: estructuras fijas frente a flexibles.¹⁰

En principio, para alcanzar un alto grado de reconocimiento, es necesario que exista una complementariedad espacial y química entre el receptor y el sustrato, es decir, el receptor debe conocer la forma, el tamaño y la naturaleza química del sustrato para poder reconocerlo entre un conjunto de moléculas. En general, se deben tener en cuenta varios factores a la hora de diseñar el receptor:

1) *Complementariedad estérica* (forma y tamaño) entre receptor y sustrato. Esto implica la existencia de dominios cóncavos y convexos complementarios entre ambas especies.

2) *Complementariedad química*; la estructura del receptor debe contener lugares de interacción complementarios con el sustrato, colocados adecuadamente entre ambas especies de modo que permitan:

a) *Enlaces de hidrógeno* entre centros básicos y ácidos.

b) *Atracción electrostática* entre centros aniónicos y catiónicos, entre dipolos, o entre dipolos y cargas.

c) *Interacciones de apilamiento aromático* entre residuos aromáticos del receptor y regiones deslocalizadas o aromáticas del sustrato.

3) *Atracciones de Van der Waals* que derivan de la interacción de una nube electrónica polarizada por núcleos adyacentes

En resumen, la complementariedad entre el receptor y el sustrato depende fundamentalmente de la arquitectura tridimensional de las moléculas, la cual debe permitir la organización de los puntos de unión para la interacción. Por lo tanto, es conveniente que tanto el sustrato como el receptor compartan una gran área de contacto entre ellos, para poder desarrollar el mayor número de interacciones no covalentes.

Con esta idea, se han diseñado numerosos receptores capaces de encapsular al sustrato formando un gran número de uniones con él al ser capaz de “detectar” su tamaño molecular, su forma e incluso su estructura electrónica. En este grupo se incluye a las moléculas receptoras que

contienen cavidades intramoleculares en las que el sustrato puede encajarse formando un complejo de inclusión conocido como criptato.¹¹ En esta clase de receptores cóncavos, los puntos de unión se encuentran distribuidos hacia el interior de la cavidad donde se situará el sustrato, de ahí que también reciban el nombre de endoreceptores. Según estas directrices, las estructuras macropolicíclicas (fig. 1.7, izquierda.) cumplen los requisitos de un buen receptor artificial: son estructuras relativamente grandes que pueden contener cavidades y hendiduras de un tamaño y forma apropiados, además pueden poseer numerosas ramificaciones, puentes y conexiones que permiten la distribución adecuada de grupos estructurales, puntos de unión y funciones reactivas. Puede parecer que esta estrategia es la más eficaz, sin embargo es muy importante mantener cierto balance entre rigidez y flexibilidad. Por un lado el diseño de receptores con una estructura organizada proporciona un elevado grado de reconocimiento y/o selectividad, ya que la preorganización reduce el gasto entrópico relacionado con la asociación,¹² y al mismo tiempo, el hecho de que el receptor no tenga que sufrir ningún cambio conformacional, supone un ahorro de energía. Sin embargo, no hay que olvidar que la necesidad de situar los puntos de unión siguiendo una determinada topología y orientación supone un gran reto sintético en especial para sustratos de gran tamaño. La convergencia de un punto de unión en el receptor hacia el punto complementario en el sustrato implica la construcción de estructuras macropolicíclicas que son difíciles de sintetizar o incluso modificar, si el primer diseño resulta no ser óptimo. Más aún, esqueletos moleculares rígidos sufren el riesgo de cinéticas de intercambio lentas, lo que no es del todo deseable si se busca una aplicación en procesos de intercambio, regulación, cooperatividad y alosterismo, ya que requieren cierto grado de

flexibilidad en la estructura del receptor para que pueda adaptarse y responder a los cambios que se producen en su entorno.

Por ello, una alternativa a las moléculas tipo criptato son los receptores de cadena abierta, en los que la molécula tiene que reorganizarse espacialmente para poder situar los puntos de unión de la manera más conveniente según las características del sustrato (figura 1.7, derecha.). Si comparamos dos receptores, cada uno siguiendo una de las dos aproximaciones con el mismo tipo y número de puntos de unión, es probable que el receptor acíclico muestre selectividades inferiores frente a un grupo de sustratos, ya que parte de la energía intrínseca de interacción la invierte en organizarse tridimensionalmente alrededor del sustrato.

Sin embargo y a pesar de este requerimiento energético, los receptores artificiales de cadena abierta mantienen alguna ventaja frente a los de estructura macrocíclica. Normalmente la síntesis y la posterior modificación es más sencilla (acortamiento o extensión de la cadena, alteración de la secuencia de los grupos de unión, etc), y son capaces de organizarse hasta adquirir una estructura óptima para el reconocimiento del sustrato, tal y como lo hacen algunos sistemas biológicos, como proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos, etc. Todos ellos tienen una estructura lineal y son capaces de organizarse hasta adquirir una estructura terciaria por plegamiento de su esqueleto.

Se puede decir por tanto, que el proceso de reconocimiento implica conseguir una complementariedad tanto geométrica como electrónica entre las partes implicadas.¹³ Un alto grado de reconocimiento por parte de un receptor, supondrá tener grandes diferencias entre las energías libres de enlace para un determinado sustrato frente al resto, con el fin de alcanzar elevadas diferencias en afinidad por el sustrato.

Por último, se debe tener en cuenta el papel que juega el medio en el proceso de reconocimiento ya que el disolvente puede interaccionar a su vez con el sustrato y el receptor. En cualquier caso, el disolvente puede afectar a la estabilidad del complejo hasta tal punto que la constante de asociación puede cambiar varios órdenes de magnitud dependiendo del tipo de disolvente. Por ello, el cambio en el disolvente de trabajo se debe tener en cuenta en el diseño del receptor, intentando que tenga dominios hidrofóbicos/hidrofílicos concordantes con el sustrato (solubilidades concordantes). Sin embargo, si lo que se pretende es construir el receptor más sofisticado y específico para señalar la presencia de un sustrato, éste debe ser capaz de comunicar al operador externo que la interacción receptor-sustrato ha tenido lugar y que el reconocimiento se ha producido. Para hacer esto posible, es necesario añadir a la estructura del receptor una subunidad molecular que muestre una propiedad perceptible y bien definida. En particular, dicha propiedad, o para ser más precisos, la cantidad que expresa la propiedad, debe cambiar drásticamente como consecuencia de la interacción receptor-sustrato, y este conjunto o sistema final compone lo que se conoce como quimiosensor. Una de las técnicas más utilizadas en esta Tesis es la espectroscopía de fluorescencia en estado estacionario, por lo que a continuación se exponen, de forma breve, los principios generales y la información que de ella se puede obtener.¹⁴

1.2. Luminiscencia.

Cuando la luz interacciona con la materia, lo puede hacer de manera que se den diferentes procesos tales como la reflexión, la difusión o la absorción (figura 1.8). La luz absorbida por las moléculas puede ser emitida a través de procesos luminiscentes o mediante procesos a través de los cuales la molécula vuelve a su estado inicial sin que se produzca emisión de radiación.¹⁵

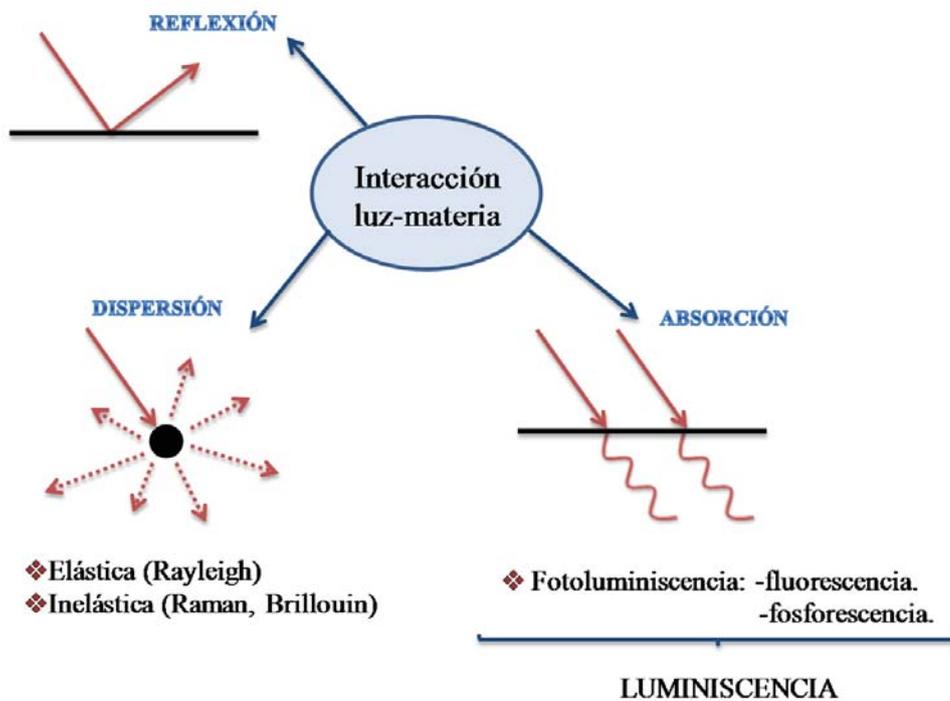


Figura 1.8. Posición del fenómeno de la fluorescencia dentro de la interacción luz-materia.¹⁶

De manera muy sencilla, la luminiscencia es el proceso por el que se emite luz. La emisión luminiscente ocurre como resultado de una transición electrónica radiativa, en la que un electrón pasa de un nivel de mayor energía a uno más bajo y la diferencia en energía entre estos dos niveles es emitida en forma de un fotón. Pero para que este proceso pueda tener lugar, previamente a la emisión, el electrón es excitado a un nivel de

energía mayor por algún método de excitación, por ejemplo, radiación electromagnética. Existen distintos fenómenos de luminiscencia, los cuales reciben nombre dependiendo del tipo de excitación por el que se absorbe energía. Algunos ejemplos son la bioluminiscencia (excitando por medio de reacciones bioquímicas), catodoluminiscencia (por rayos catódicos), quimioluminiscencia (por reacciones químicas), electroluminiscencia (por un campo eléctrico), piezoluminiscencia (por presión), radioluminiscencia (por radiación ionizante), o la fotoluminiscencia (por medio de luz visible o ultravioleta).¹⁶

Dentro del espectro electromagnético (figura 1.9), la región ultravioleta-visible (UV-Vis) es la que resulta de interés para este trabajo de investigación, que corresponde a longitudes de onda entre los 190 nm y los 800 nm. Se conoce que la luz (o radiación electromagnética) que es absorbida por las moléculas presenta tanto propiedades corpusculares como ondulatorias ("dualidad onda-corpúsculo"). El comportamiento de la radiación electromagnética depende de su longitud de onda, de su frecuencia (inversamente proporcionales) y de su amplitud.

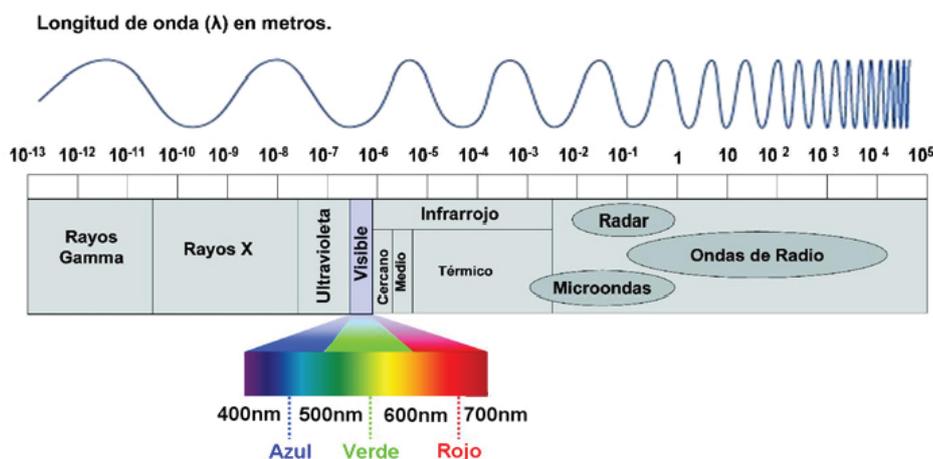


Figura 1.9. Dibujo de un espectro electromagnético.

Básicamente las ondas electromagnéticas están compuestas por un campo eléctrico (E) y un campo magnético (B) perpendicular a éste, que oscila en fase según la dirección de propagación (k) (figura 1.10). La luz se comporta como una onda en fenómenos tales como la refracción que tiene lugar en una lente, o en la cancelación por interferencia destructiva de ondas reflejadas.

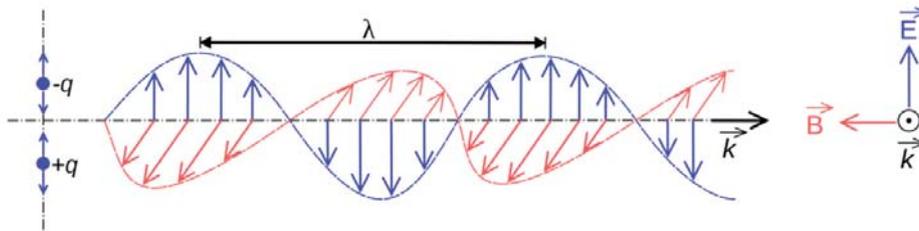


Figura 1.10. Ondas electromagnéticas representadas como campos eléctricos y magnéticos oscilatorios ($-q$ y $+q$ representan las cargas eléctricas).

Pero además, la radiación electromagnética tiene propiedades de partícula que se manifiestan como unidades o paquetes de energía, llamados fotones. En física moderna, el fotón (en griego $\phi\omega\tilde{\nu}\varsigma$, $\phi\omega\tau\acute{o}\varsigma$ [luz], y -ón) es la partícula elemental responsable de las manifestaciones cuánticas del fenómeno electromagnético. Se puede decir que un fotón es la partícula portadora de todas las formas de radiación que aparecen en el espectro electromagnético (figura 1.9), incluyendo a los rayos gamma, los rayos X, la luz ultravioleta, la luz visible, la luz infrarroja, las microondas, y las ondas de radio.

Se puede calcular la energía de un fotón, E , a partir de la ecuación de Planck-Einstein (ecuación 1.1), donde h es la constante de Planck y ν es la frecuencia de su onda electromagnética asociada. Mediante el empleo de este modelo se puede explicar los espectros de absorción y emisión de luz tanto de átomos como de moléculas.

$$E = \frac{h}{\nu} \quad (\text{ec. 1.1})$$

1.2.1. Tipos de transiciones electrónicas en moléculas poliatómicas.

Para entender los efectos macroscópicos de la absorción de un fotón por una molécula, es necesario explicar primero los procesos que tienen lugar a nivel microscópico. Las moléculas se pueden definir como sistemas polieletrónicos para los que la ecuación de Schrödinger no puede ser resuelta de forma exacta, por lo que las funciones de onda electrónica (Ψ) se pueden describir, de forma aproximada, mediante el producto de funciones de onda monoeléctricas ($\prod_i \varphi_i \cdot s_i$), constituidas a su vez por el producto de una parte orbital (φ_i) y otra correspondiente al espín (s_i). De esta forma, todos los electrones de la molécula se colocan en los diferentes orbitales moleculares disponibles, cumpliendo el principio de Exclusión de Pauling y la regla de máxima multiplicidad de Hund para poder definir una configuración electrónica concreta que se denomina *estado fundamental*. Cuando un electrón se promociona a un orbital desocupado de mayor energía mediante la absorción de un fotón, se dice que ha tenido lugar una transición electrónica y que la molécula se encuentra en un *estado excitado*.¹⁷

Existen diferentes tipos de orbitales moleculares según el tipo de orbitales atómicos implicados. Así, se pueden distinguir los orbitales sigma (σ), los orbitales pi (π) y los orbitales no enlazantes (n). En la figura 1.11 se muestra el diagrama de energía de los orbitales moleculares (izquierda) y las posibles transiciones electrónicas que pueden ocurrir entre ellos (derecha) para el caso del formaldehído. Las energías de estas transiciones

electrónicas siguen generalmente el siguiente orden:

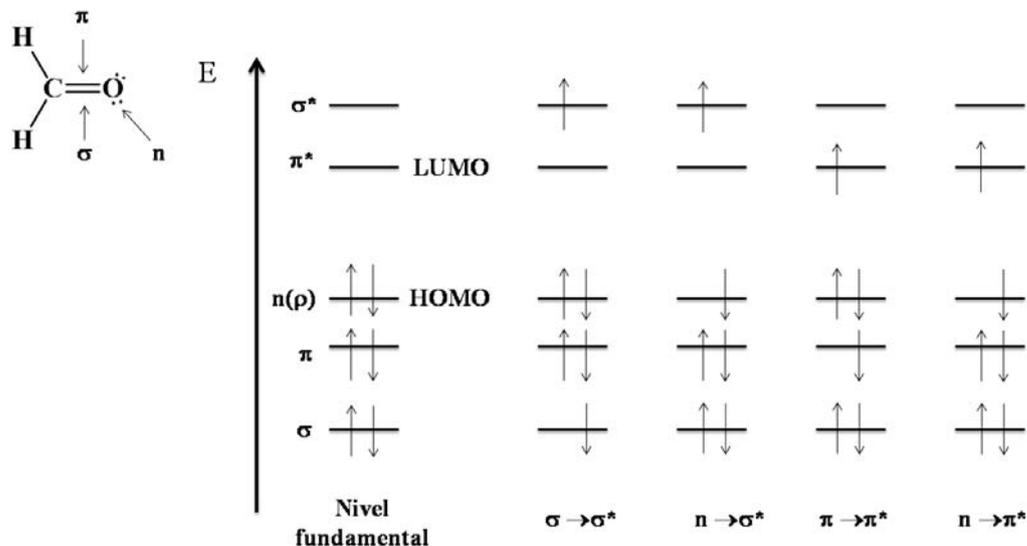
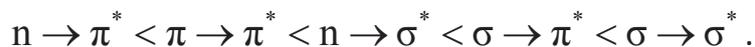


Figura 1.11. Niveles de energía de los orbitales moleculares del formaldehído y las posibles transiciones electrónicas.¹⁶

En la espectroscopía de absorción y de emisión de fluorescencia, los orbitales moleculares que siempre se encuentran implicados, y por lo tanto los más importantes para nosotros, son el orbital molecular ocupado de mayor energía (*Highest Occupied Molecular Orbital*) HOMO y el orbital molecular vacío de menor energía (*Lowest Unoccupied Molecular Orbital*) LUMO. Cuando uno de los dos electrones presentes en un orbital molecular de una molécula en el estado fundamental es transferido a un orbital molecular de mayor energía, su spin no se ve modificado, por lo que el número cuántico total de spin ($S = \sum s_i$ con $s_i = \pm \frac{1}{2}$) permanece igual a cero. En estos casos la multiplicidad del estado fundamental y del estado excitado ($M = 2S + 1$) es igual a la unidad por lo que ambos se llaman estados singlete y se representan mediante S_n . Sin embargo existen casos en los que una molécula que se encuentra en un estado excitado singlete,

puede evolucionar a un estado donde el electrón cambia su spin. En estos casos el número cuántico total de spin S es 1 (los dos electrones tienen spin paralelo), por lo que la multiplicidad es igual a 3. Dado que ahora se tienen 3 estados con el mismo nivel de energía, se dice que tenemos un estado triplete, representado por T_n . En la figura 1.12 se muestra de manera esquemática esta situación para el caso general (izquierda), y para el caso de la molécula de formaldehído (derecha). Según la regla de máxima multiplicidad de Hund, el estado triplete tiene un nivel de energía inferior que el estado singlete con la misma configuración.

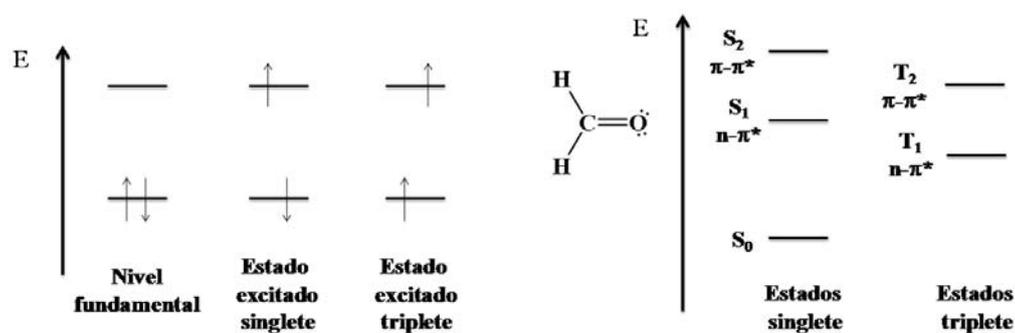


Figura 1.12. Diferencias entre los estados singlete y triplete (izqda.) para un caso general y para la molécula de formaldehído (drcha.).¹⁶

1.2.2. Características de la emisión de fluorescencia.

Una vez conocida la distribución energética de los orbitales moleculares, la primera etapa en cualquier proceso fotoquímico es la absorción de un fotón de energía $h\nu$ por una molécula que pasa de un estado fundamental (A), a un estado energético superior inestable llamado estado excitado (A*). Según las reglas de selección, las transiciones desde estados fundamentales a estados excitados que tienen la misma multiplicidad están permitidas y proporcionan bandas de absorción intensas, mientras que las transiciones entre estados de diferente espín están prohibidas. A la hora de evaluar la mayoría de procesos fotoquímicos, los estados electrónicos involucrados son principalmente tres: el estado fundamental singlete y los primeros estados excitados singlete y triplete, que se caracterizan por su energía, tiempo de vida y estructura.¹⁸

Cuando el electrón se ha promocionado a un nivel energético superior, la molécula se encuentra en un estado excitado A* inestable, por lo que debe buscar un mecanismo para perder su exceso de energía y restablecer el estado fundamental original. Este proceso puede ocurrir mediante desprendimiento de energía en forma de calor (denominado mecanismo de desactivación no radiativo), por emisión de luz (mecanismo de desactivación radiativa o luminiscencia), mediante la desaparición de la molécula original para formar algún producto dando lugar a una reacción fotoquímica, o mediante la interacción con alguna otra especie presente en la disolución. En la figura 1.13 se recogen todos los posibles mecanismos de desactivación.

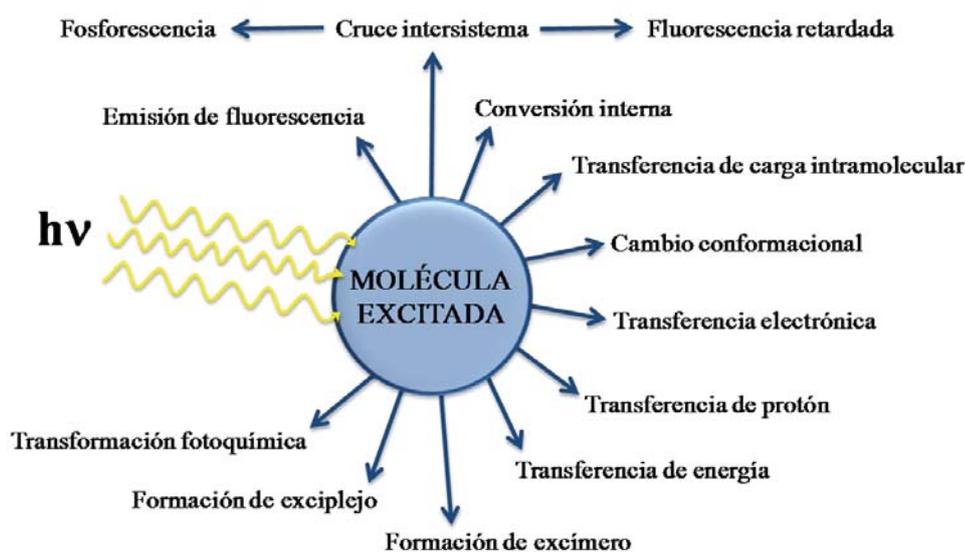
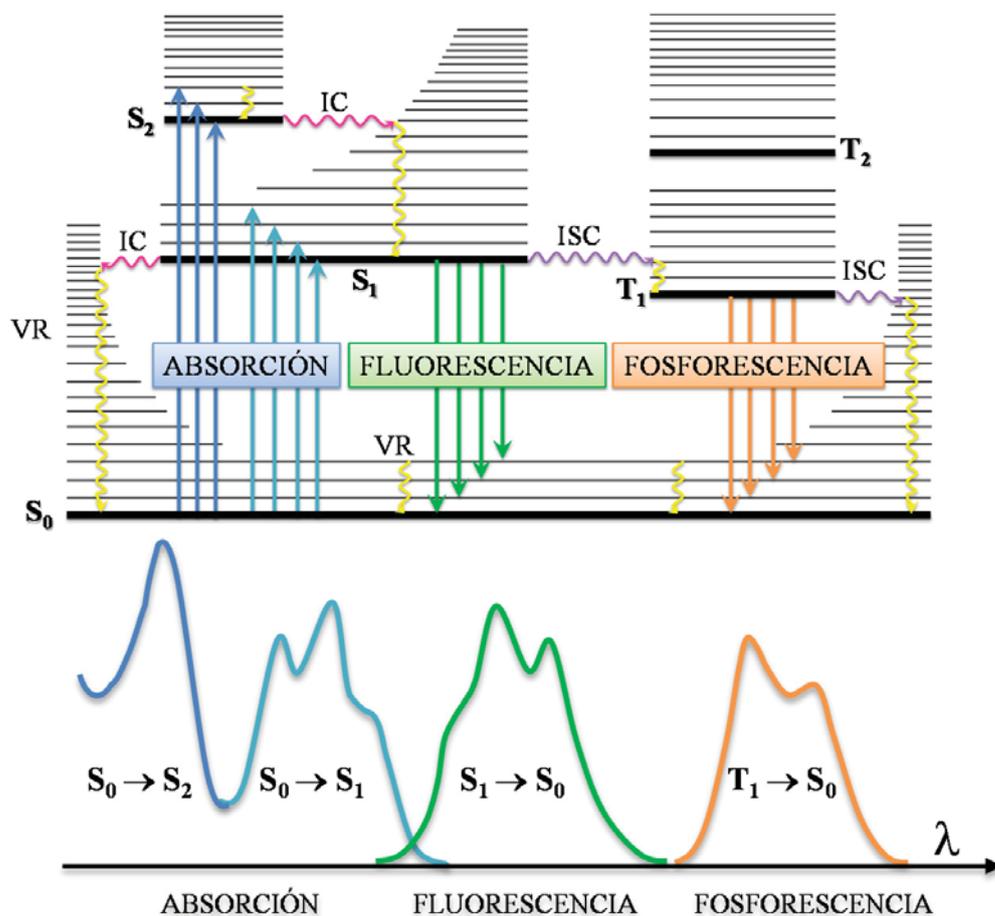


Figura 1.13. Posibles mecanismos de desactivación.

Para poder estudiar de manera sencilla todos estos procesos se recurre al diagrama de Perrin-Jablonski (figura 1.14).¹⁹ Las flechas verticales corresponden al proceso de absorción desde el nivel de energía vibracional más bajo del estado fundamental (S_0) hasta uno de los niveles vibracionales situados en los estados excitados (S_1 , S_2 , etc). Normalmente el proceso de absorción siempre se produce desde el nivel vibracional más bajo del estado fundamental ($\nu = 0$ en S_0) ya que según la ley de Boltzmann la mayoría de moléculas se encuentran en este nivel a temperatura ambiente. Una vez el electrón se encuentra en un estado excitado, puede volver a su estado fundamental a través de varios procesos en función de la multiplicidad de espín del estado excitado.

Dentro de los mecanismos de desactivación radiativa se denomina fluorescencia al proceso en el que el estado excitado y el estado fundamental tienen la misma multiplicidad de espín, mientras que se conoce como fosforescencia al mismo proceso pero entre estados con diferente multiplicidad. De la misma manera, cuando el mecanismo que

tiene lugar es no radiativo, se puede distinguir entre conversión interna (IC, por *internal conversión*) o cruce intersistema (ISC, por *intersystem crossing*) dependiendo de nuevo si la transición ocurre entre estados con el mismo o con diferente espín respectivamente.²⁰



Absorción	10^{-15} s	
(VR) Relajación vibracional	$10^{-12} - 10^{-10}$ s	
Tiempo de vida del estado excitado S_1	$10^{-10} - 10^{-7}$ s	→ FLUORESCENCIA
(ISC) Cruce intersistema	$10^{-10} - 10^{-8}$ s	
(IC) Conversión interna	$10^{-11} - 10^{-9}$ s	
Tiempo de vida del estado excitado T_1	$10^{-6} - 1$ s	→ FOSFORESCENCIA

Figura 1.14. Diagrama de Perrin-Jablonski junto con una representación de las posiciones relativas de los espectros de absorción, fluorescencia y fosforescencia y un resumen de los tiempos de vida media de los procesos mostrados en él.¹⁶

Otra característica que acompaña a estos procesos de desactivación es su cinética. Aquellos procesos permitidos por la regla de selección de espín (fluorescencia y conversión interna) se caracterizan por tener tiempos de desactivación más cortos que los procesos de desactivación que implican transiciones prohibidas (fosforescencia y cruce intersistema). Además, existe la posibilidad que la molécula en el estado excitado interaccione con otras moléculas dando lugar a procesos de transferencia electrónica, transferencia de protón, transferencia de energía o formación de excímeros o exciplejos. Todos estos procesos de relajación no-radiativos son los responsables de que la fluorescencia se origine siempre desde el estado S_1 , que su perfil no varíe con la longitud de onda de excitación y que el máximo de emisión siempre se sitúe a mayores longitudes de onda (menor energía) que el máximo de absorción. En una situación ideal los dos estados electrónicos involucrados directamente en la desactivación se pueden considerar como osciladores armónicos idénticos sin desplazamiento en las coordenadas nucleares, es decir, que las diferencias entre los niveles vibracionales en el estado fundamental (S_0) y en el primer estado excitado (S_1) son similares, de manera que macroscópicamente se obtiene una imagen especular entre el espectro de absorción y el de emisión respecto al valor de la energía de la transición vibracional $\nu_0-\nu_0$. (figura 1.15).

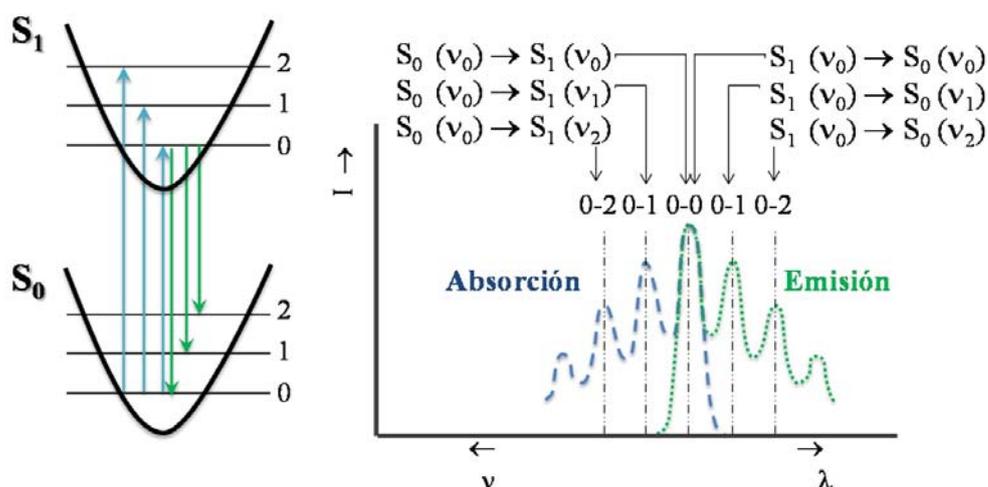


Figura 1.15. Diagrama de energía potencial con posibles transiciones verticales según el principio de Franck-Condon (izquierda). Perfil de las bandas de absorción y emisión (derecha).

Sin embargo, se debe tener en cuenta que en realidad los niveles vibracionales dentro de un estado electrónico concreto (S_n) no se encuentran equiespaciados y que su posición responde al modelo de un oscilador anarmónico (fig 1.16, izquierda) de manera que según el principio de Franck-Condon, la transición electrónica más probable (la más intensa) es aquella que ocurre sin cambios en las posiciones de los núcleos en la molécula y su entorno. Al estado final se le conoce como estado de Franck-Condon y a la transición involucrada se le llama transición vertical.²¹ En la figura 1.16 se puede ver el perfil de absorción para dos situaciones diferentes, donde las intensidades de las transiciones dependen de la posición relativa y de la forma de las curvas de energía potencial.

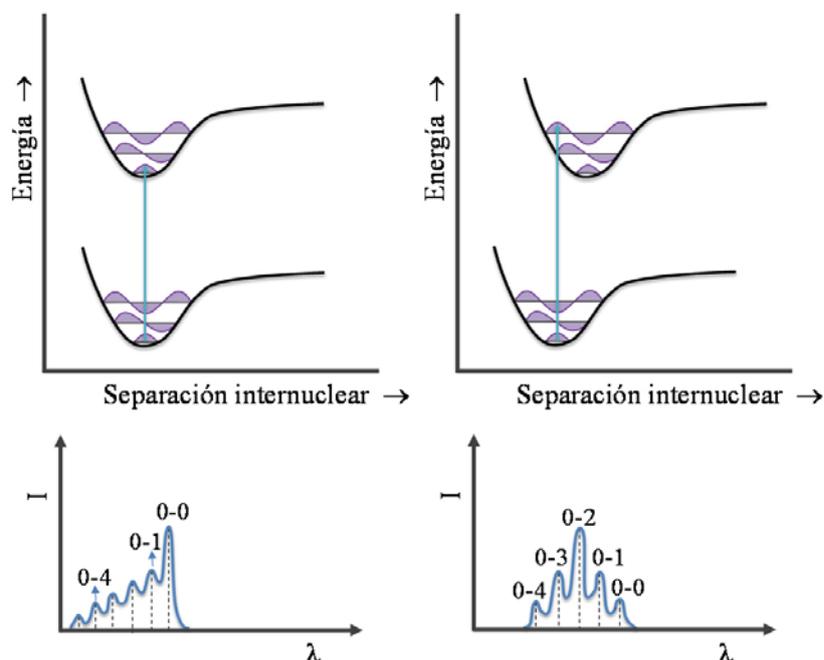


Figura 1.16. Diagrama de energía potencial (parte superior). Perfil de las bandas de absorción (parte inferior).

Cuando se comparan los espectros de absorción y emisión de fluorescencia de algunos sistemas reales, se puede ver una separación de los máximos de cada proceso, conocido como desplazamiento de Stokes ($\Delta\lambda$ nm), en los que una molécula fluorescente absorbe luz de una determinada longitud de onda y emite luz de una longitud de onda más alta (figura 1.17).²² La magnitud de este desplazamiento, centrado en la transición vibracional $\nu_0-\nu_0$, es una forma simple y directa de medir la diferencia en geometría y propiedades entre el estado fundamental y excitado, de forma que cuanto más pequeño sea su valor, las diferencias en forma, tamaño y solvatación del estado excitado en comparación con el estado fundamental son también pequeñas. Debido a esta propiedad de simetría, el valor de la energía correspondiente a la transición $\nu_0-\nu_0$ (E_{0-0}) que separa los estados electrónicos fundamental y excitado puede obtenerse bien del punto de intersección de los espectros de absorción y

emisión normalizados o mediante el valor medio de sus correspondientes máximos.

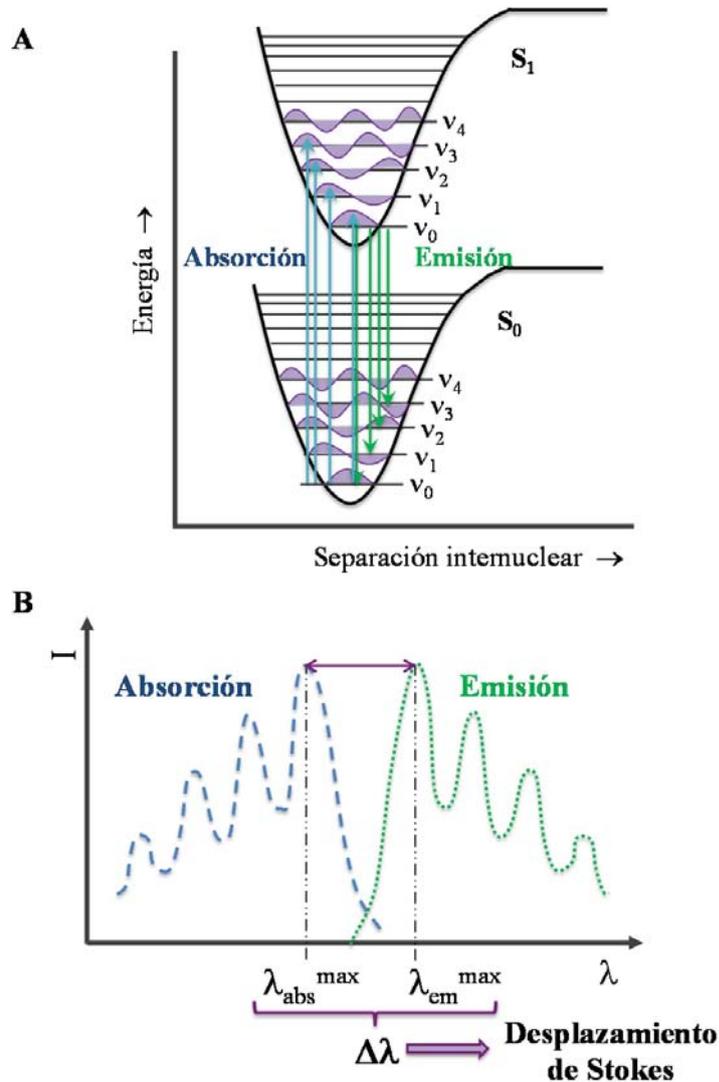


Figura 1.17. Representación del desplazamiento de Stokes.

En la figura 1.18 se muestran tres ejemplos prácticos de las posibilidades descritas anteriormente. En la figura de la izquierda se muestra el espectro de absorción y emisión del perileno, un hidrocarburo policíclico aromático usado en biología como sonda lipídica fluorescente. Esta molécula tiene un espectro de absorción que es la imagen especular

del espectro de emisión, coincidiendo perfectamente las transiciones $\nu_0-\nu_0$. En la figura del medio se muestra el caso de la fluoresceína, sustancia colorante orgánica hidrosoluble perteneciente al grupo de las xantinas, que produce un color fluorescente verde intenso en soluciones alcalinas. En este caso, las transiciones $\nu_0-\nu_0$ no coinciden de manera que se puede observar el correspondiente desplazamiento de Stokes. Y por último, en la figura de la derecha se muestra el ejemplo de la ficocianobilina, un compuesto tetrapirrólico lineal presente como grupo prostético cromóforo en las proteínas ficocianobilinas, donde se ha perdido completamente la simetría entre los espectros de absorción y emisión.

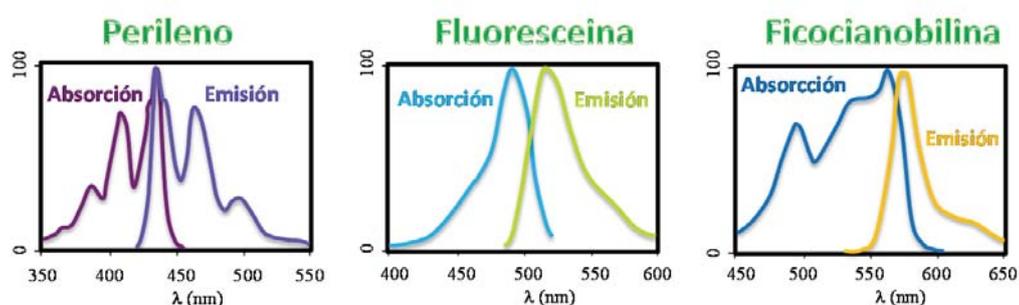


Figura 1.18. Espectros de absorción y emisión que aparecen como imágenes especulares (izquierda), con desplazamiento de Stokes (medio) y totalmente diferentes (derecha).

Además del desplazamiento de Stokes, existen parámetros cinéticos muy útiles a la hora de caracterizar los procesos de desactivación que tienen lugar en estos sistemas, ya que al ser procesos unimoleculares se describen mediante su propia velocidad (a excepción del mecanismo bimolecular), que sigue una cinética de primer orden caracterizada por una constante de velocidad k , medida en s^{-1} (ecuación. 1.2).

$$-\frac{d[A^*]}{dt} = k[A^*] \quad (\text{ec. 1.2})$$

Normalmente la constante k se expresa como su inversa, conocida como tiempo de vida media τ , que se define como el tiempo promedio que un fluoróforo pasa en el estado excitado antes de volver al estado fundamental (ecuación 1.3), donde k_r^S es la constante de velocidad del proceso de desactivación radiativa del estado S_1 al S_0 con emisión de fluorescencia, y k_{nr}^S es la correspondiente constante de velocidad para el proceso no radiativo.

$$\frac{1}{k} = \tau = \frac{1}{(k_r^S + k_{nr}^S)} \quad (\text{ec. 1.3})$$

Otro parámetro importante es el rendimiento cuántico Φ que informa de la eficacia de cada proceso fotoquímico. Se define como la fracción de moléculas excitadas que regresan al estado fundamental con la emisión de fotones o, en otras palabras, como la relación entre el número de fotones emitidos (durante todo el proceso de desactivación) y el número de fotones absorbidos (ecuación 1.4).

$$\Phi = k_r^S \tau = \frac{k_r^S}{k_r^S + k_{nr}^S} \quad (\text{ec. 1.4})$$

A la hora de evaluar la cinética de los mecanismos de desactivación que puede sufrir una molécula A en el estado excitado se pueden diferenciar dos situaciones. En la primera de ellas no existen reacciones fotoquímicas ni desactivación por procesos bimoleculares, por lo que se puede definir un tiempo de vida media τ_i (ecuación 1.5) y un rendimiento

cuántico independiente para cada una de las tres vías de desactivación posibles: fluorescencia (fl, ecuación 1.6), conversión interna (ci, ecuación 1.7) o cruce intersistema (cis, ecuación 1.8). Cada rendimiento cuántico vendrá definido por el tiempo de vida media τ_t y por una constante de velocidad específica, siendo k_{fl} , k_{ci} y k_{cis} la constante de velocidad del proceso de fluorescencia, conversión interna y cruce intersistema respectivamente.

$$\tau_t = \frac{1}{k_{fl} + k_{ci} + k_{cis}} \quad (\text{ec. 1.5})$$

$$\Phi_{fl} = k_{fl}\tau_t = \frac{k_{fl}}{k_{fl} + k_{ci} + k_{cis}} \quad (\text{ec. 1.6})$$

$$\Phi_{ci} = k_{ci}\tau_t = \frac{k_{ci}}{k_{fl} + k_{ci} + k_{cis}} \quad (\text{ec. 1.7})$$

$$\Phi_{cis} = k_{cis}\tau_t = \frac{k_{cis}}{k_{fl} + k_{ci} + k_{cis}} \quad (\text{ec. 1.8})$$

$$\Phi_{fl} + \Phi_{ci} + \Phi_{cis} = 1 \quad (\text{ec. 1.9})$$

Puede ocurrir sin embargo que los anteriores mecanismos de desactivación intramolecular no sean demasiado rápidos, lo que se traduce en que el tiempo de vida media del estado excitado es lo suficientemente largo para que la molécula excitada A^* tenga la oportunidad de encontrarse con otra molécula Q, denominada desactivador (*Quencher*), de forma que ocurra algún tipo de interacción entre ellas que produzca un proceso de desactivación bimolecular (*Quenching*). Los estados excitados que satisfacen esta condición son los estados singlete y triplete más bajos (S_1 y

T₁). Además, los procesos bimoleculares más importantes son procesos de transferencia de energía o de electrones.^{20b, 23}

Dentro de los procesos de desactivación bimoleculares se pueden diferenciar varios casos. Cuando la cinética depende de forma directa de la concentración de la sustancia desactivadora Q, se conoce como desactivación dinámica (ya que la desactivación desde el estado excitado al estado fundamental se produce por colisión entre el estado excitado y la especie Q). En este caso, la presencia de Q produce una disminución del tiempo de vida de dicha especie excitada τ y, una disminución de la intensidad de la emisión I (ya que la especie Q añade otro posible mecanismo de desactivación que compite con la luminiscencia). Este proceso está controlado por la rapidez con que Q puede difundirse a través de la disolución y colisionar con A*, y normalmente, dado que la difusión es un proceso muy rápido, la desactivación dinámica es un proceso muy eficiente.

$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 + k_Q \tau_0 [Q] \quad (\text{ec. 1.10})$$

A partir de los resultados experimentales obtenidos de tiempos de vida en ausencia y en presencia de la especie Q (τ_0 y τ respectivamente) se puede conocer si la desactivación sigue una cinética exponencial de primer orden (ecuación 1.10). En este caso se puede obtener directamente el valor de la constante de velocidad del proceso de desactivación bimolecular k_Q . A su vez, a partir de la relación entre el rendimiento cuántico en ausencia y en presencia de la sustancia desactivadora (Φ_0 y Φ respectivamente) se obtiene la ecuación 1.11 conocida como la relación de Stern-Volmer,

donde I_0 e I son las intensidades de fluorescencia en ausencia y en presencia de Q respectivamente.

$$\frac{\Phi_0}{\Phi} = \frac{I_0}{I} = 1 + k_Q \tau_0 [Q] = 1 + K_{SV} [Q] \quad (\text{ec. 1.11})$$

$$K_{SV} = k_Q \tau_0 \quad (\text{ec. 1.12})$$

Según este procedimiento se puede obtener la denominada constante de Stern-Volmer (K_{SV}). Normalmente, se representa la relación I_0/I frente a la concentración de especie Q (gráfica de Stern-Volmer), y si la variación es lineal, la pendiente de la recta nos proporciona la constante de Stern-Volmer. De esta forma, la constante de velocidad del proceso de desactivación k_Q puede calcularse si se conoce el tiempo de vida media del estado excitado en ausencia de la molécula desactivadora (τ_0).

Un caso diferente es el conocido como desactivación estática en el que Q se asocia de alguna manera con la molécula A en disolución previamente a la absorción de luz. Esta asociación puede inducir cambios en las propiedades de la molécula A de manera que no se produzca la posterior desactivación radiativa. Por lo tanto, la disminución en la intensidad de la emisión se verá afectada por el grado de asociación entre A y Q y el número de especies desactivadoras presentes. Al igual que en el caso anterior, la disminución en la emisión de fluorescencia puede cuantificarse mediante la ecuación de una línea recta (ecuación 1.13), similar en forma a la ecuación de Stern-Volmer. Sin embargo, la interpretación es diferente ya que al representar I_0/I , la pendiente cuantifica la constante de asociación (K_S) entre A y Q , por lo que se puede obtener información de cómo interaccionan estas dos especies en el estado fundamental.

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_s[Q] \quad (\text{ec. 1.13})$$

Dado que la gráfica de intensidad de emisión frente a concentración de especie desactivadora produce el mismo efecto en los dos casos, es necesario encontrar una manera de diferenciarlos. Si se piensa detenidamente en la naturaleza del proceso que se está llevando a cabo, se puede llegar a la conclusión que en un proceso dinámico todas las especies fluoróforas (A) se ven afectadas por el proceso de desactivación ya que es probable que todas ellas colisionen durante su tiempo de vida en el estado excitado (figura 1.19, izquierda), por lo que tanto la intensidad de la emisión como el tiempo de vida se reducirán al incrementar la concentración de especie desactivadora (Q). Sin embargo, en un proceso de desactivación estático, solo las asociaciones A-Q provocan una disminución de la emisión, mientras que las especies que no forman esta asociación mantienen su emisión original. Un aumento de la concentración de Q afectará a la emisión (ya que aumenta el número de asociaciones), pero no al tiempo de vida, ya que las especies A libres pueden seguir emitiendo como si Q no estuviera presente (figura 1.19, derecha) (Hay que tener en cuenta que estas dos situaciones son extremas y hay casos en los que se puede dar una combinación de ambos de manera simultánea).

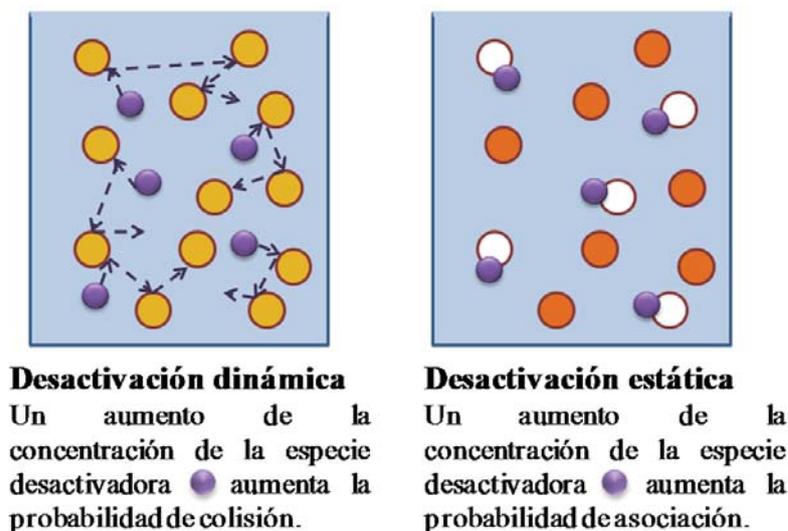


Figura 1.19. Representación de la desactivación dinámica frente a la estática.

Por lo tanto, para poder distinguir estos dos procesos, es muy útil comparar cómo varía la emisión de fluorescencia y el tiempo de vida con la concentración de especie desactivadora. En el caso de un proceso de desactivación dinámica ambas representaciones coincidirán, mientras que en el caso de un proceso de desactivación estático, sólo la representación de la intensidad de emisión relativa cambiará, permaneciendo prácticamente constante la representación del tiempo de vida (figura 1.20).

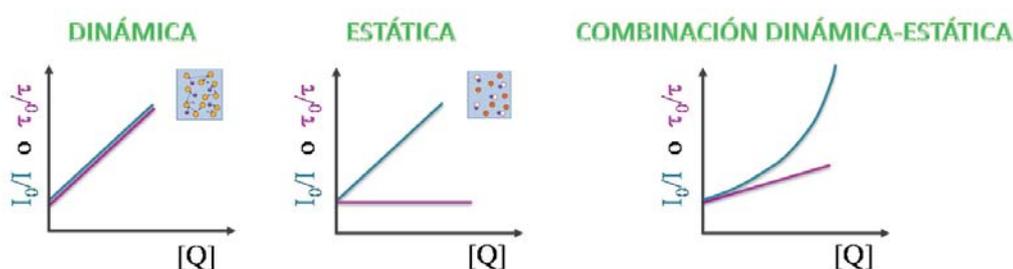


Figura 1.20. Representación gráfica utilizada para distinguir un proceso de desactivación dinámico de uno estático, o una combinación de ambos.

En la figura 1.21 se muestra un caso práctico que se ajusta a esta clase de sistemas. En el lado izquierdo de la figura se muestra el espectro

de emisión de fluorescencia de una poliamina lineal que tiene un grupo naftaleno en uno de sus extremos. Se observa una disminución de la intensidad de la emisión del ligando al adicionar cantidades crecientes de hexacianocobalto(III), el cual actúa de especie desactivadora Q. En el lado derecho de la figura 1.21 se muestra la relación I_0/I o τ_0/τ frente a la concentración de Q. Se puede ver cómo la línea de color fucsia no se ajusta de manera clara a una línea recta, lo que indica que se está formando una asociación en el estado fundamental y por tanto, el mecanismo de desactivación es estático.²⁴

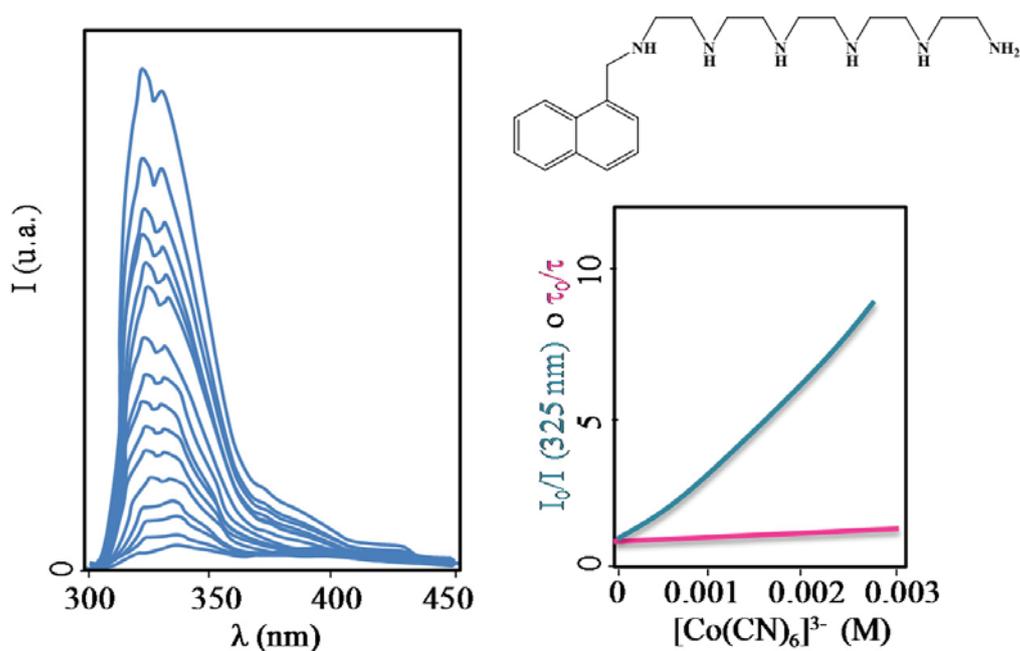


Figura 1.21. Emisión de fluorescencia del ligando mostrado en la figura a pH = 2 al añadir cantidades crecientes de hexacianocobalto(III) (izquierda). Representación de Stern-Volmer empleando la intensidad de emisión de fluorescencia (azul) o tiempos de vida (fresa), (derecha).

1.3. Sensores ópticos.

1.3.1. Sensores moleculares ópticos.

Una de las aplicaciones más importantes de los receptores abióticos es su empleo para el desarrollo de sensores moleculares. La unión de un receptor específico con una subunidad capaz de señalar la interacción receptor-sustrato mediante la emisión de una señal macroscópica define a un sensor molecular. La eficiencia del sensor está relacionada tanto con la selectividad del proceso de reconocimiento como con la facilidad y simplicidad de detección y medida de la señal mostrada.²⁵

En función del tipo de señal emitida, los sensores químicos moleculares, también denominados quimiosensores, pueden clasificarse en térmicos, de masas, electroquímicos, magnéticos y ópticos. La presente tesis doctoral está basada en el desarrollo de sensores ópticos por las ventajas que proporciona su uso frente al resto:

- Permiten la detección ocular en el caso de absorción en el espectro visible.
- Requieren una instrumentación simple, asequible y económica.
- Emplean métodos de detección no destructivos.
- Utilizan poca cantidad de muestra.
- Medición en tiempo real.

A la hora de revisar la bibliografía existente en el campo del reconocimiento a través de cambios espectroscópicos, se han detectado diferentes maneras de nombrar a los sensores moleculares ópticos: sondas

ópticas, quimiosensores ópticos, etc, todos ellos en principio equivalentes. Sin embargo, no hay que confundirlo con el término de sensor óptico.

Un sensor óptico hace referencia al dispositivo mecánico sensible a un cambio externo capaz de transmitir una señal a un instrumento de control o medida. Esta descripción incluye a la unidad receptora, la unidad señalizadora, el sistema óptico y el detector. Por otro lado, para evitar confusiones, se suele llamar sensor molecular óptico únicamente a la asociación receptor-unidad señalizadora.¹⁶ Otra distinción importante se debe tener en cuenta cuando aparece el término de sensor químico (también llamados quimiosensor) y biosensor. En los primeros, la respuesta al analito es de origen abiótico, mientras que los segundos, surgen como respuesta a una macromolécula biológica, por ejemplo una proteína.

Desde un punto de vista clásico, el diseño de este tipo de quimiosensores incluye dos partes fundamentales: un receptor responsable del reconocimiento molecular del sustrato y una unidad señalizadora. Sin embargo, en la actualidad existen principalmente 5 estrategias a la hora de diseñar indicadores moleculares ópticos para el reconocimiento químico en disolución (figura 1.22).^{26,27} A continuación se comentan algunos ejemplos en los que se puede ver la aplicación de la química supramolecular al desarrollo de sensores moleculares mediante el empleo de técnicas espectroscópicas: emisión de fluorescencia o absorción ultravioleta visible (UV-vis).

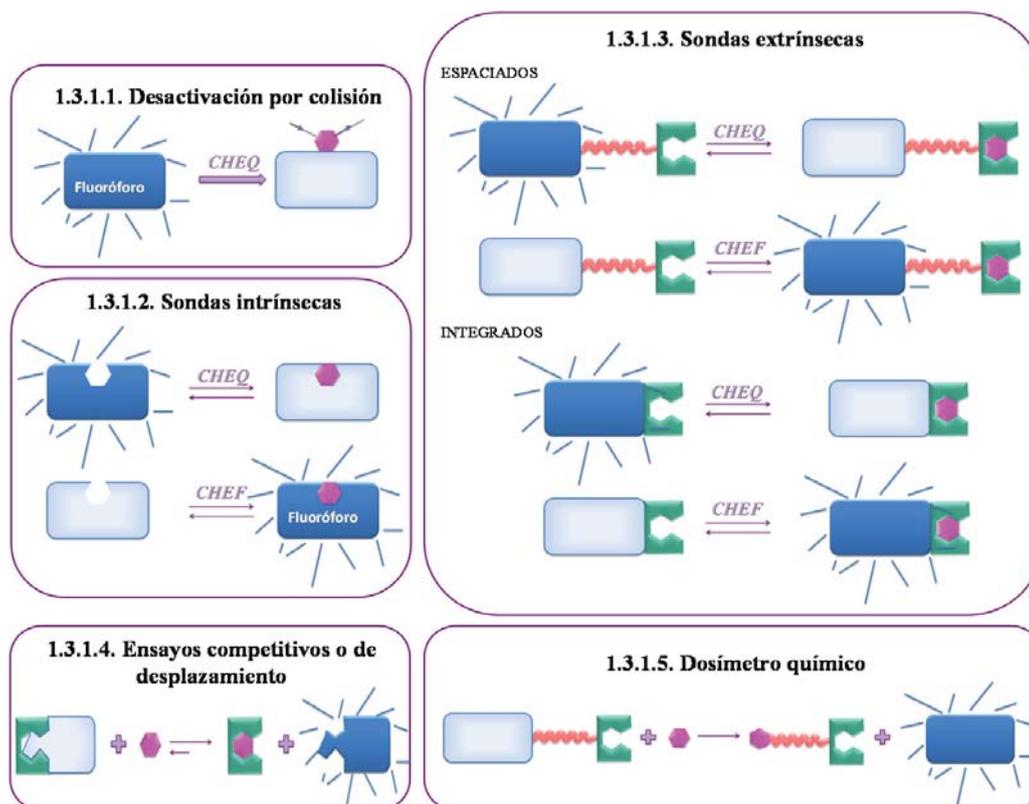


Figura 1.22. Diseño de quimiosensores para iones y moléculas.²⁶

1.3.1.1. Desactivación por colisión.

Muchos sensores moleculares fluorescentes diseñados para el reconocimiento de haluros, se basan en la desactivación de la fluorescencia tras la colisión con el sustrato. En particular, la determinación de cloruro en células vivas se realiza siguiendo este procedimiento.²⁸ Otro ejemplo en el que se emplea este principio para la detección selectiva de yoduro fue desarrollado por A. Corma y H. García *et al.*,²⁹ en el que unidades de pireno se unen de manera covalente a una zeolita. Como resultado final se obtiene un quimiosensor heterogéneo para I₂ en presencia de otros haluros (figura 1.23).

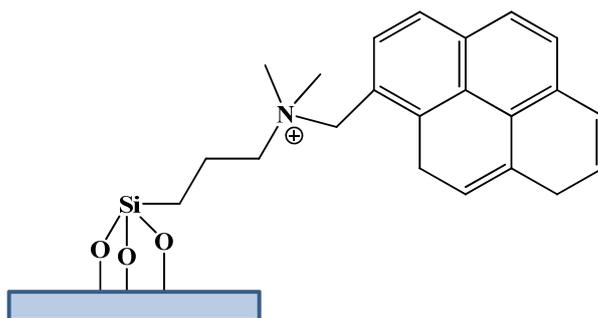


Figura 1.23. Diseño de un quimiosensor fluorogénico de I_2 a través de colisión con el sustrato.

1.3.1.2. Sondas intrínsecas.

La segunda estrategia para la síntesis de quimiosensores se basa en la obtención de una unidad señalizadora que actúa al mismo tiempo como unidad complejante.³⁰ En este caso, los cambios espectroscópicos obtenidos implican una interacción reversible del analito o sustrato con el receptor que forma parte del sistema π del fluoróforo/cromóforo. A la hora de trabajar con un quimiosensor fluorescente, el reconocimiento puede dar lugar a dos tipos de respuesta mayoritarias. Por un lado, el reconocimiento del sustrato puede producir un aumento de la intensidad de emisión (*CHEF*) o por el contrario, la unión con el sustrato puede provocar una disminución de la intensidad de fluorescencia (*CHEQ*). Cuando el sustrato que se quiere reconocer son protones, se usa el término “indicador fluorescente de pH” y si el sustrato es un ion, se le puede denominar “agente quelante fluorescente”. A continuación se muestran algunos ejemplos clásicos basados en esta estrategia.

1.3.1.2.1. Sondas intrínsecas fluorescentes.

La determinación de aluminio mediante espectroscopía de fluorescencia se lleva realizando desde hace más de un siglo. Goppelsröder fue el primero en detectar la emisión de fluorescencia de extractos alcohólicos de Cubawood (*Morus tinctoria*) en presencia de alumbre en 1867 debido a la formación de un quelato con el aluminio.³¹ En la figura 1.24 se muestra la estructura del ácido cromotrópico empleado por E. Bardez *et al.* para la detección cuantitativa de aluminio(III).³² Asimismo, a la derecha de la figura se muestra la gráfica en la que se representa la emisión de fluorescencia del ligando (línea discontinua), y el aumento de intensidad que experimenta la emisión (línea continua) cuando se forma el complejo 1:1 con aluminio.

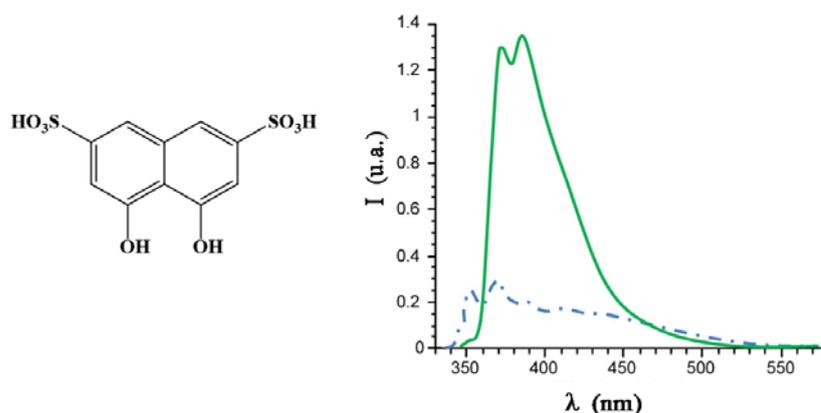


Figura 1.24. Sonda fluorogénica intrínseca para la detección de Al(III).

1.3.1.2.2. Sondas intrínsecas cromogénicas.

El sistema de la figura 1.25 es un ejemplo típico de esta aproximación. En este caso la unidad coordinante consiste en una agrupación tiourea que tiene un carácter dador débil conectada con un

grupo nitro de carácter electrón aceptor a través de un sistema conjugado. Este compuesto es inicialmente incoloro, pero cuando se coordina con aniones básicos como por ejemplo acetato (a través de interacciones por puentes de hidrógeno) se produce un desplazamiento hacia longitudes de onda mayores, y el color de la disolución cambia a amarillo. Este desplazamiento en el espectro visible se basa el hecho de que la coordinación del acetato hace que el grupo tiourea sea más electrón dador, ya que se produce un aumento en la transferencia de carga desde el acetato a la tiourea, y por lo tanto, se aumenta el carácter electrón aceptor del grupo nitro.³³

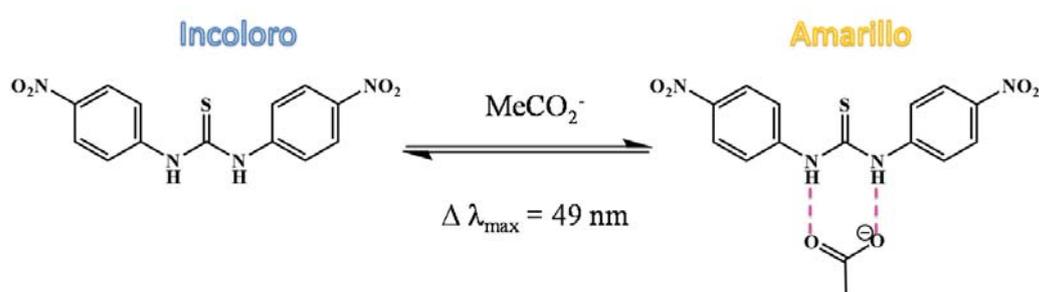


Figura 1.25. Sonda cromogénica intrínseca para la detección de acetato.

1.3.1.3. Sondas extrínsecas.

Como tercera opción a la hora de diseñar un quimiosensor se quiere presentar la formación de **sondas ópticas extrínsecas** en las que el receptor y el fluoróforo están covalentemente unidos pero son electrónicamente independientes.³⁴ En este sentido, se pueden sintetizar diferentes moléculas receptoras que después se unen a un fluoróforo para formar el quimiosensor fluorescente. Se pueden distinguir dos casos en la síntesis de sondas extrínsecas ya que la unión covalente entre la unidad señalizadora y el receptor se puede llevar a cabo mediante la introducción o no de un

espaciador. En ambos casos ambas partes están espacialmente muy próximas por lo que la interacción del sustrato con el receptor induce un cambio en el entorno químico del fluoróforo, y por lo tanto, induce un cambio en la respuesta fluorescente.³⁵

Este tipo de sistemas en los que la unidad señalizadora se encuentra unida a una unidad receptora se empezaron a desarrollar a finales del siglo XX. Un ejemplo pionero fue el sistema desarrollado por el grupo de da Silva *et al.* en el que un aza éter corona se encuentra unido a una unidad antraceno mediante un grupo metileno. Este ligando se emplea para la detección de metales del bloque *s*.³⁶ La adición de sodio o potasio a la disolución provoca un aumento considerable de la emisión de fluorescencia de la unidad antraceno, mientras que la adición de litio no produce ningún cambio. Este comportamiento se debe a que en ausencia del metal se produce una transferencia electrónica (TE) del par de electrones solitario del nitrógeno hacia el fluoróforo, inhibiendo la emisión de fluorescencia. Cuando se introduce un metal capaz de coordinarse al nitrógeno, se consigue bloquear esa transferencia electrónica y recuperar la emisión de fluorescencia del antraceno (figura 1.26).

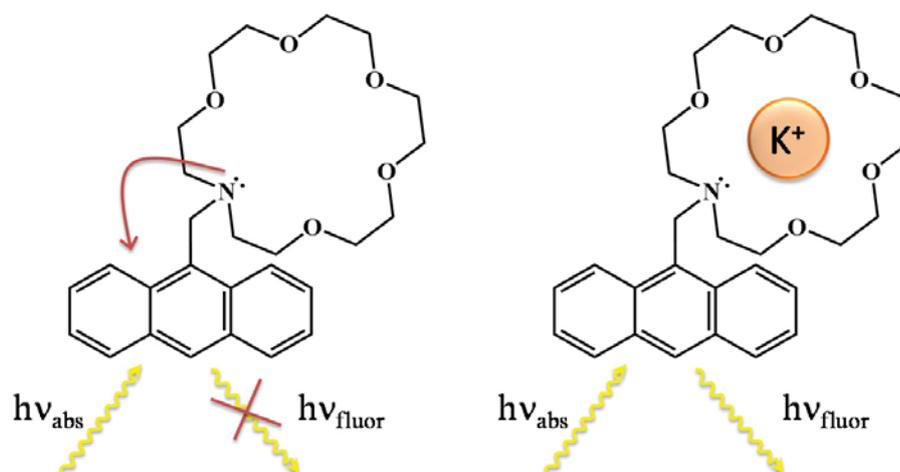


Figura 1.26. Sonda fluorescente extrínseca para la detección de potasio.

1.3.1.4. Ensayos competitivos o de desplazamiento.

La cuarta estrategia consiste en la síntesis de sistemas quimiosensores basados en **ensayos competitivos** (figura 1.27). En este caso el receptor y la unidad señalizadora no se encuentran unidos mediante una unión covalente sino formando un complejo.³⁷ Cuando se añade un determinado sustrato a la asociación receptor-unidad señalizadora, se produce una reacción de desplazamiento por la que el receptor pasa a formar un complejo con el sustrato liberando a la unidad señalizadora. Si las características espectroscópicas de la unidad señalizadora cuando está formando el complejo con el receptor y cuando se encuentra libre son distintas, se obtiene una respuesta que está relacionada con la presencia del sustrato en la disolución.^{38, 39}

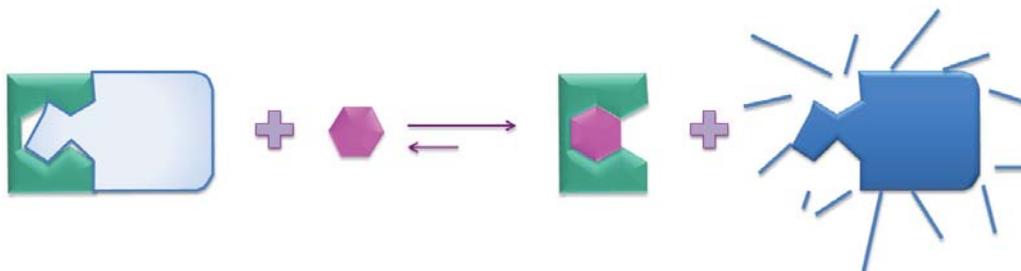


Figura 1.27. Esquema de un ensayo de desplazamiento.

En este tipo de ensayos, es conveniente que la constante de estabilidad para la formación del complejo entre el receptor y el sustrato sea mayor que la correspondiente al complejo receptor-unidad señalizadora, ya que si es menor, es necesario adicionar una mayor cantidad de sustrato para conseguir la reacción de desplazamiento, con lo que la sensibilidad disminuye de manera notable. Además, se puede conseguir cierta selectividad mediante una selección cuidadosa de la pareja receptor-unidad señalizadora haciendo que esta tenga una constante de

formación más alta que la que pueda tener el receptor con posibles sustratos interferentes.⁴⁰

1.3.1.4.1. Ensayos de desplazamiento fluorescentes.

Un ejemplo de ensayo de desplazamiento en el que se emplea la emisión de fluorescencia como señal indicadora es el desarrollado por Boger *et al.*⁴¹ La figura 1.28 muestra de manera esquemática en qué consiste este tipo de ensayos.

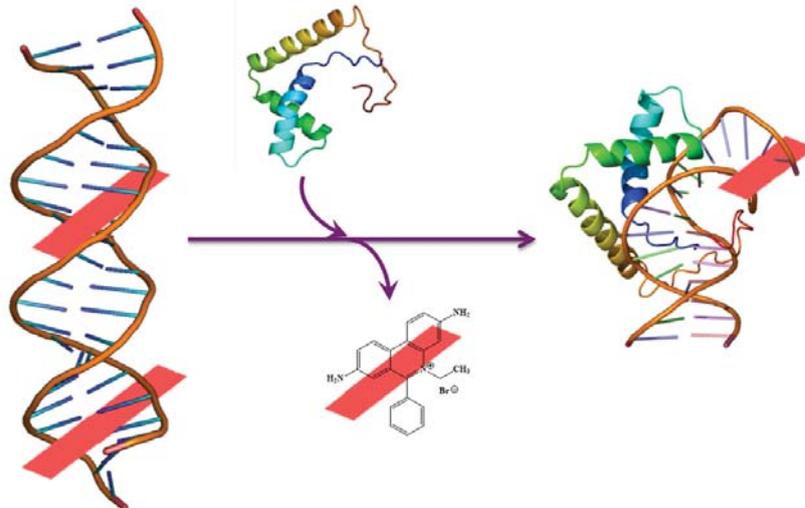


Figura 1.28. Ensayo competitivo entre la proteína LEF-1 y el bromuro de etidio por la interacción con ADN.

Se parte de una disolución que contiene una fibra de ADN con moléculas de bromuro de etidio intercaladas en su estructura. En estas condiciones la emisión de fluorescencia del intercalante es elevada, ya que las bases nucleicas presentes en la doble hebra se encuentran interaccionando con el bromuro de etidio mediante apilamiento de tipo π . Cuando se añade una secuencia de nucleótidos específica como la HMG

(representada normalmente como 5'-CTTTGWW, siendo W = A o T) presente en la proteína LEF-1 (factor de aumento de enlace linfático) se produce una liberación del fluoróforo a la disolución ya que la constante de interacción de la HMG con la doble hebra es mayor que la que existe entre el ADN y el bromuro de etidio. La liberación progresiva del intercalante a la disolución se corresponde con una disminución progresiva de la emisión de fluorescencia.

1.3.1.4.2. Ensayos de desplazamiento cromogénicos.

Para mostrar una aplicación de los ensayos de desplazamiento colorimétricos al reconocimiento supramolecular, se ha escogido el trabajo desarrollado por el grupo de E. V. Anslyn, en el que se emplean receptores enantioselectivos para discriminar los enantiómeros de la hidrobenczoína (figura 1.29).⁴²

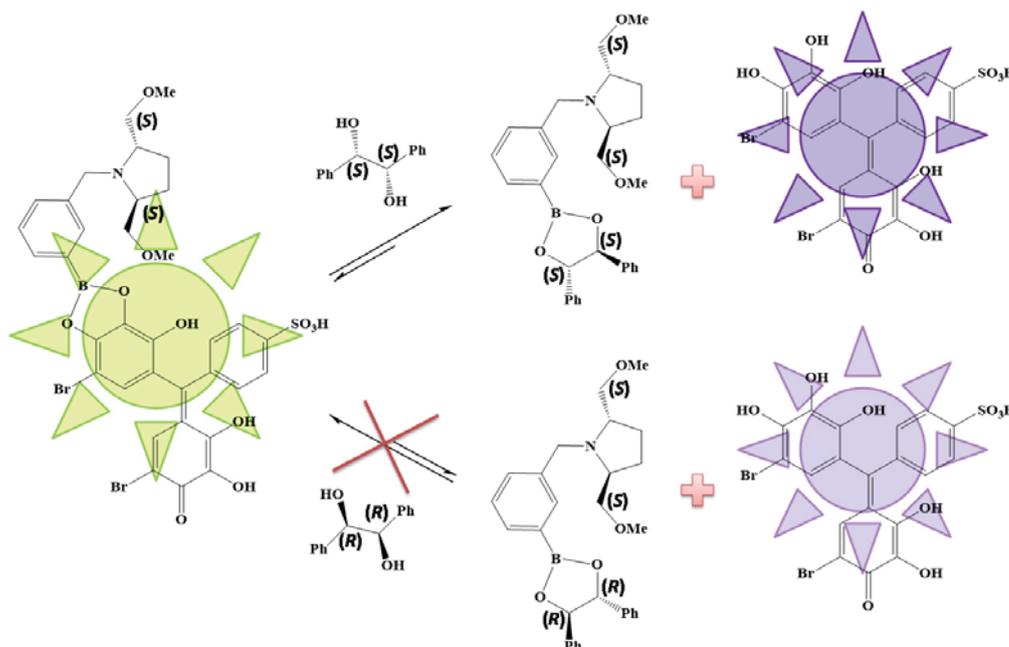


Figura 1.29. Ensayo de desplazamiento colorimétrico para el reconocimiento de enantiómeros.

Se parte de un complejo formado entre el ácido borónico que actúa de receptor y el violeta de pirocatecol como unidad señalizadora. Mientras que al añadir el diastereoisómero (S,S) de la hidrobencoina se libera el cromóforo a la disolución con el consiguiente cambio de color, no se produce el mismo efecto cuando se añade el diastereoisómero (R,R). Por lo tanto se puede decir que el ligando empleado como receptor es enantioméricamente selectivo.

1.3.1.5. Dosímetro químico.

En esta categoría nos encontramos aquellos sistemas que no se pueden denominar estrictamente sensores ópticos, ya que normalmente utilizan reacciones químicas irreversibles. Para llevar a cabo el proceso de detección no es necesario el desarrollo de receptores que interaccionen de manera selectiva con un sustrato como en los casos anteriores, sino que normalmente se hace uso de reacciones químicas específicas, generalmente irreversibles, inducidas por el sustrato y que conllevan un cambio en la respuesta de la unidad señalizadora (figura 1.30).^{43,44}

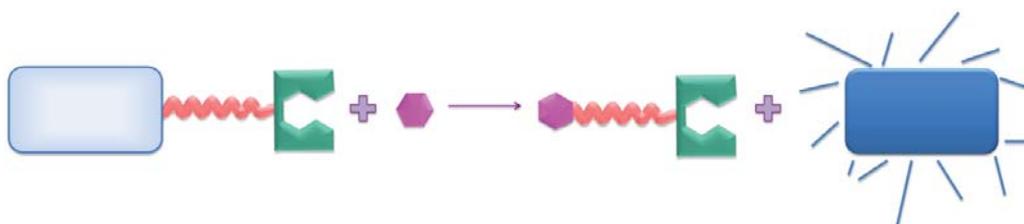


Figura 1.30. Esquema de un dosímetro químico.

1.3.1.5.1. Dosímetro fluorogénico.

Un ejemplo de dosímetro químico que utiliza la espectroscopía de fluorescencia se muestra en la figura 1.31. La reducción del receptor en agua tamponada a $\text{pH} = 7.5$ se produce en presencia de NADH que actúa como reductor. La reacción redox produce la liberación de la umbeliferona, especie altamente fluorescente (banda de emisión centrada a 450 nm). Utilizando esta reacción irreversible se puede detectar la presencia de NADH mediante el aumento de la intensidad de emisión fluorescente.⁴⁵

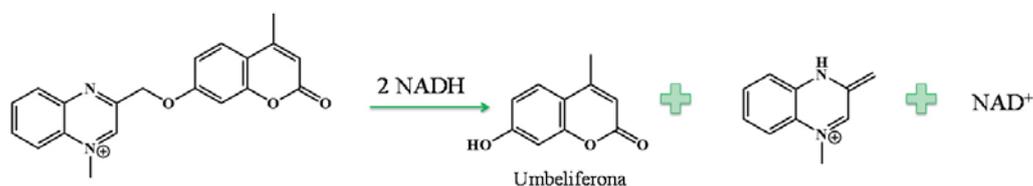


Figura 1.31. Dosímetro fluorogénico para la detección de NADH.

1.3.1.5.2. Dosímetro cromogénico.

Finalmente se presenta un ejemplo de dosímetro químico asociado a cambios colorimétricos. El receptor que se muestra en la figura 1.32 reacciona con el anión sulfuro dando lugar a la apertura del ciclo. Una adición posterior de ácido induce la ciclación para dar el derivado anilina-tiopirilio. Esta reacción provoca un cambio de color desde el sistema anilina-pirilio inicial de color magenta hasta el sistema anilina-tiopirilio de color azul, lo que permite un reconocimiento visual del anión sulfuro. Esta reacción es muy selectiva y sólo tiene lugar en presencia de sulfuros por lo que otros aniones como fluoruro, cloruro, sulfato y fosfato no inducen cambio alguno de color.⁴⁶

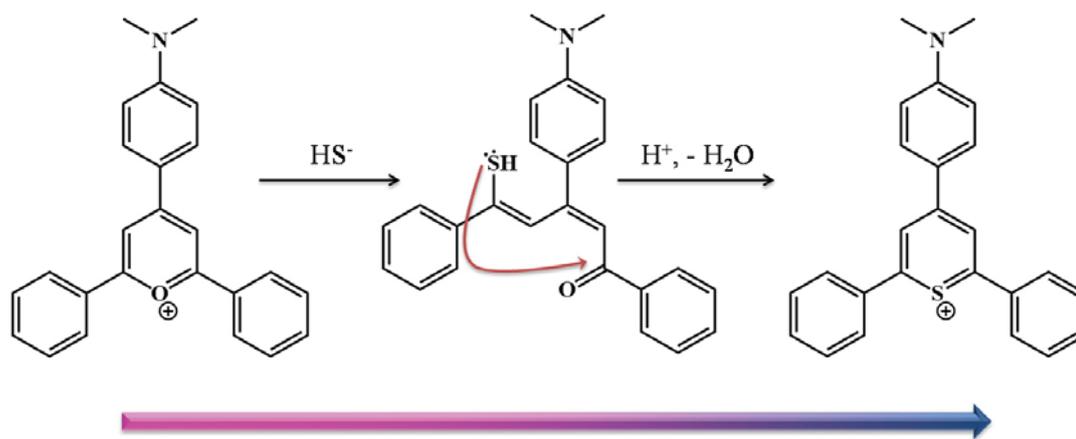


Figura 1.32. Dosímetro cromogénico empleado en la detección de sulfuro.

1.3.2. Sensores moleculares fluorogénicos.

Existen diferentes mecanismos que permiten utilizar la variación de la intensidad de la emisión de fluorescencia como señal indicadora. Una posible clasificación de estos mecanismos (mostrada a continuación) se basa en el proceso electrónico que tiene lugar.^{27,47}

Por transferencia electrónica fotoinducida (PET).⁴⁸

Por transferencia electrónica (ET).

Por transferencia de carga (CT).

Por transferencia de carga fotoinducida (PCT).

Transferencia de carga interna (ICT).

Transferencia de carga metal-ligando (MLCT).

Transferencia interna de carga con torsión (TICT).

Por formación/desaparición de excímeros.

Por transferencia de energía electrónica (EET).

Transferencia de energía por resonancia (FRET).

Por transferencia del protón en el estado excitado (ESPT).

A continuación se describirán algunos ejemplos de los procesos más comunes que tienen lugar en la química de los sensores fluorescentes.²⁷

1.3.2.1. Por transferencia electrónica fotoinducida (PET, *photoinduced electron transfer*) y transferencia electrónica (ET, *electron transfer*).

Este tipo de mecanismo ha sido ampliamente utilizado en el campo de los sensores fluorescentes. La figura 1.33 muestra cómo un sustrato puede controlar la transferencia de carga fotoinducida (PET, *photoinduced electron transfer*) en un sensor en el que el receptor actúa como dador electrónico (p.e. un grupo amino) y el fluoróforo actúa como aceptor. Cuando el fluoróforo se excita, un electrón del orbital ocupado de más alta energía (HOMO) se transfiere al orbital no ocupado de más baja energía (LUMO). En este momento, un electrón presente en el HOMO del receptor dador puede pasar a ocupar la vacante del HOMO del fluoróforo forzando de esta manera la desactivación no radiativa del fluoróforo y por tanto la supresión de la emisión de fluorescencia (figura 1.33, izquierda.).

En muchos sensores fluorescentes basados en procesos PET, el receptor consta de aminas de carácter alifático o aromático que actúan como desactivadores de la fluorescencia (ya que este mecanismo de desactivación se produce desde los grupos amino a hidrocarburos aromáticos produciendo la desactivación en la emisión de fluorescencia de

este último.). El estudio que se lleva a cabo con estos sistemas es la influencia de “agentes externos” sobre esa desactivación de la fluorescencia. Por ejemplo, cuando el $\text{pH} < \text{pK}_a + 1$, el protón fomentará la fluorescencia, ya que cuando la amina se encuentra en su forma protonada, el par de electrones del nitrógeno se encuentra interaccionando con el protón, y ya no le es posible impedir la desactivación del electrón que se encuentra en el LUMO del fluoróforo (figura 1.33, derecha.). Lo mismo sucede en los casos en los que el sustrato que se quiere reconocer es un metal con la capa de electrones “d” completa (no participa en procesos redox como tampoco lo hacen los metales alcalinos), los electrones de los nitrógenos de la poliamina se bloquean por medio de su participación en el enlace con el catión. La desactivación del fluoróforo se produce entonces mediante emisión de fluorescencia.

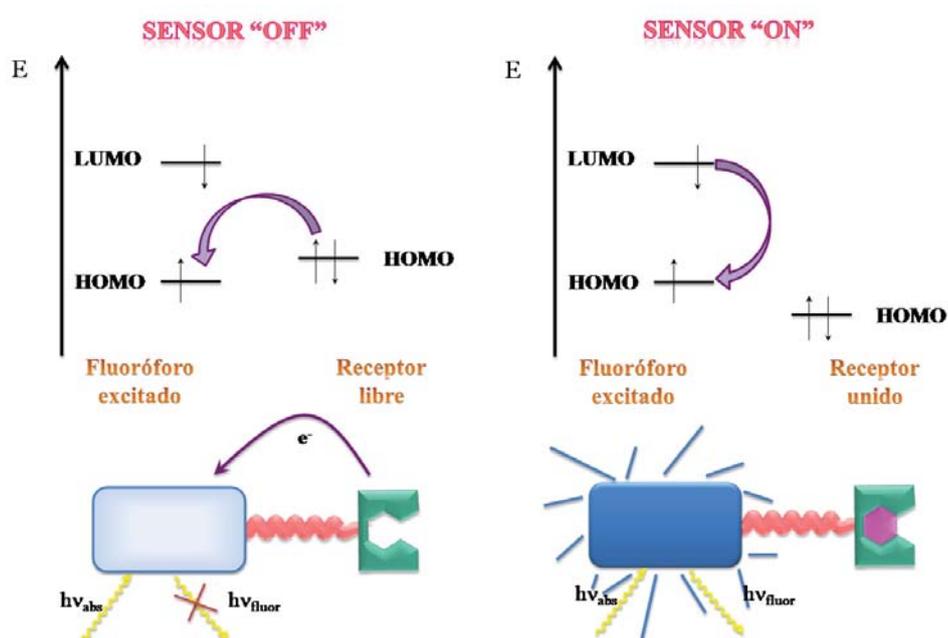


Figura 1.33. Reconocimiento catiónico mediante quimiosensores de tipo PET.

Aunque muchos sistemas fluorescentes basados en este mecanismo siguen el esquema desarrollado anteriormente, existe una alternativa

cuando el sustrato es un metal de transición que presenta actividad redox. En este caso se puede dar otro mecanismo de desactivación de la fluorescencia conocido como transferencia electrónica (ET) que sucede desde el fluoróforo hacia el metal coordinado o viceversa.

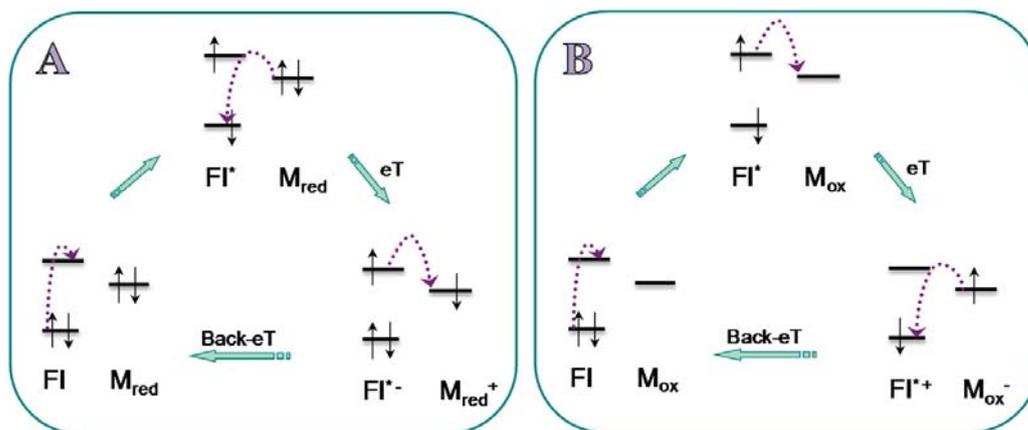


Figura 1.34. Efecto de la presencia de cationes con tendencia reductora (A) y oxidante (B) sobre la emisión de fluorescencia.

En el caso de cationes con cierta tendencia reductora (figura 1.34, A), el metal proporciona un electrón al HOMO del fluoróforo inhibiendo la desactivación de su propio electrón. El electrón que se encuentra en el LUMO semiocupado del fluoróforo puede pasar hasta el orbital semiocupado del metal por retrodonación (back-ET, proceso no radiativo), de manera que se regeneran los estados fundamentales de cada uno. De forma parecida sucede con cationes con tendencia oxidante (figura 1.34, B). El electrón excitado pasa al orbital vacío del metal y por retrodonación vuelve al HOMO del fluoróforo.

Como ejemplo práctico de esta clase de mecanismos en la figura 1.35 se muestra un sensor molecular fluorescente basado en una cadena poliamínica unida a un antraceno mediante un grupo metileno.⁴⁹ Este tipo de sistemas presenta una gran versatilidad en cuanto a su aplicación, siendo

una de ellas su uso como miméticos de puertas lógicas electrónicas, ya que dependiendo del metal (“input”) se obtienen diferentes respuestas como se puede ver en la gráfica, donde se ha representado la intensidad de la emisión de fluorescencia en función del pH y del metal. Mientras que el Zn(II) y el Cd(II) tienen un efecto CHEF sobre la emisión de fluorescencia del ligando, cationes como el Cu(II) y el Ni(II) provocan una desactivación de la misma.

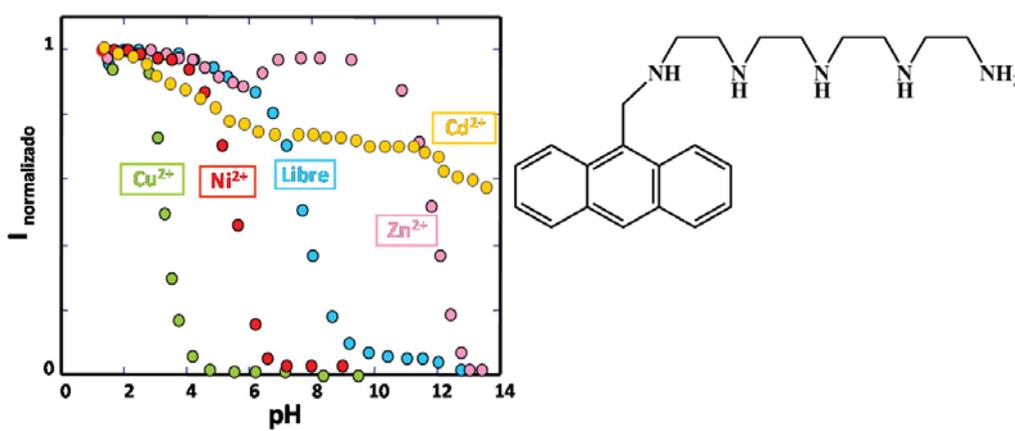


Figura 1.35. Variación de la emisión de fluorescencia de un ligando poliamínico en función del pH y del catión metálico adicionado.

1.3.2.2. Por transferencia de carga fotoinducida (PCT).

Cuando un fluoróforo contiene un grupo electrón dador conjugado con un grupo electrón aceptor, se puede producir una transferencia interna de carga (ICT, por *Internal charge transfer*) desde el grupo dador al aceptor tras la excitación. Este tipo de sistemas exhiben normalmente un desplazamiento de Stokes alto, son excitados en la zona del espectro visible y su máximo de emisión se ve desplazado cuando se encuentra coordinado a un centro metálico. Además, cuando el dador o el aceptor interacciona con otras especies, se producen cambios en las propiedades fotofísicas del

fluoróforo debido a que la unión entre el receptor y el metal afecta a la eficacia de la transferencia de carga intramolecular. Dado que tanto el grupo receptor como el fluoróforo pueden ser dadores o aceptores, se va a describir brevemente las dos posibilidades.

Cuando un grupo electrón dador interacciona con un catión, ve reducido su carácter dador y macroscópicamente se puede observar un desplazamiento hacia el azul en el espectro de absorción junto con una disminución del coeficiente de extinción. Contrariamente a esta situación, cuando un catión se coordina a un grupo electrón aceptor, se produce un aumento en el carácter electrón aceptor del receptor, lo que conlleva un desplazamiento hacia el rojo del espectro de absorción junto con un aumento del coeficiente de extinción.

Estos cambios también se pueden explicar en términos de interacción carga-dipolo. Consideremos por ejemplo el caso en el que el momento dipolar en el estado excitado es mayor que en el estado fundamental. Cuando el catión interacciona con un grupo electrón dador el estado excitado se encuentra más estabilizado que el estado fundamental lo que se traduce en un desplazamiento del espectro de absorción y emisión hacia el azul (figura 1.36, arriba). Por el contrario, cuando el catión interacciona con un grupo electrón aceptor, el estado excitado se estabiliza en mayor medida que el estado fundamental, por lo que el desplazamiento del espectro de absorción y emisión se produce hacia el rojo (figura 1.36, abajo).

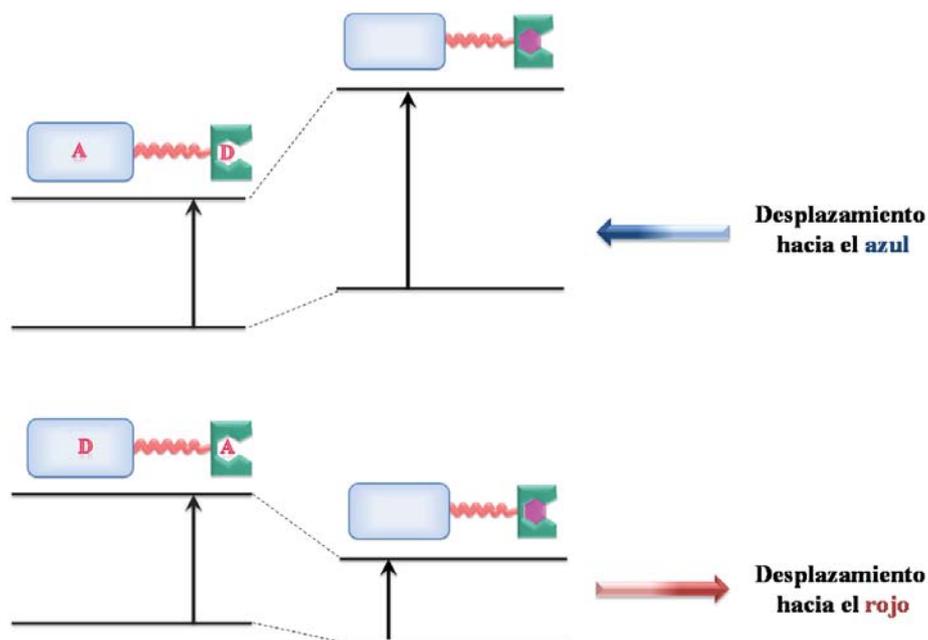


Figura 1.36. Desplazamientos espectrales debidos a la interacción de un grupo electrón dador (arriba) o electrón aceptor (abajo) con un catión.

Los efectos que la interacción con el sustrato tiene en los espectros de emisión de fluorescencia, deben ser en principio los mismos que en los espectros de absorción. Además, junto con el desplazamiento del máximo de emisión es usual ver cambios tanto en los rendimientos cuánticos como en los tiempos de vida. Todos estos efectos fotofísicos no son constantes sino que dependen de la carga y del tamaño del catión, de la naturaleza del sustrato y por tanto de la fuerza de la interacción, o en otras palabras del grado de selectividad del reconocimiento.

Como ejemplo de sensor molecular para cationes alcalinos se ha escogido el criptando con unidades indol que se muestra en la figura 1.37. Este tipo de quimiosensor ha sido diseñado de manera específica para el reconocimiento intracelular de iones sodio. En este sistema las unidades de indol actúan como fluoróforo y el criptando es el responsable de la coordinación del catión sodio. Cuando se produce el reconocimiento, la

banda de emisión situada inicialmente a 460 nm se desplaza hacia 395 nm, a la vez que la intensidad en la emisión de fluorescencia se incrementa en un factor de 25. Este ligando presenta un elevado desplazamiento de Stokes que puede explicarse a través de una transferencia de carga fotoinducida que sucede simultáneamente junto con una rotación interna en el estado excitado, lo que finalmente conduce a una transferencia interna de carga con torsión (TICT, *twisted internal charge transfer*).⁵⁰ Tras la coordinación del ión metálico se produce un desplazamiento del máximo de emisión que se debe a la reducción del carácter electrón dador del receptor y, en particular de los grupos amino que forman parte de la estructura del criptando.⁵¹

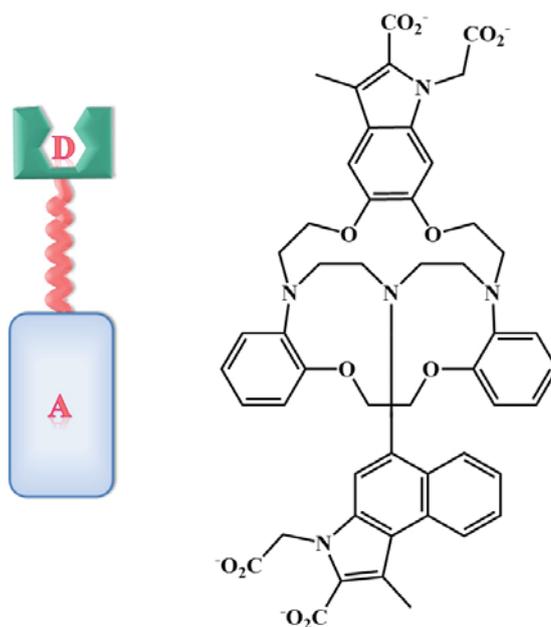


Figura 1.37. Quimiosensor en el que la unidad receptora tiene carácter electrón dadora.

Al contrario que en el ejemplo anterior, existen sólo unos pocos casos en los que el catión interacciona con la parte electrón aceptora del quimiosensor. El ejemplo que se muestra en la figura 1.38 es uno de ellos,

y se basa en el empleo de un éter corona unido a una cumarina. A pesar de que existe una unidad espaciadora entre el fluoróforo y el éter corona, este diseño es de especial interés ya que el catión interactúa directamente con el grupo electrón aceptor (p.e. el grupo carbonilo).⁵² Como consecuencia, los complejos formados son más estables en comparación con éteres corona que no presentan estos átomos coordinantes externos. Desde el punto de vista de las propiedades fotofísicas de este sistema, cabe recordar que el momento dipolar de las aminocumarinas en el estado excitado es mayor que en el estado fundamental, y que se produce una transferencia de carga fotoinducida desde el átomo de nitrógeno del anillo del éter corona hacia el grupo carbonilo. Cuando el ligando coordina un catión, el estado excitado se ve más estabilizado que el estado fundamental, por lo que macroscópicamente se observa un desplazamiento de los espectros de absorción y emisión hacia el rojo.

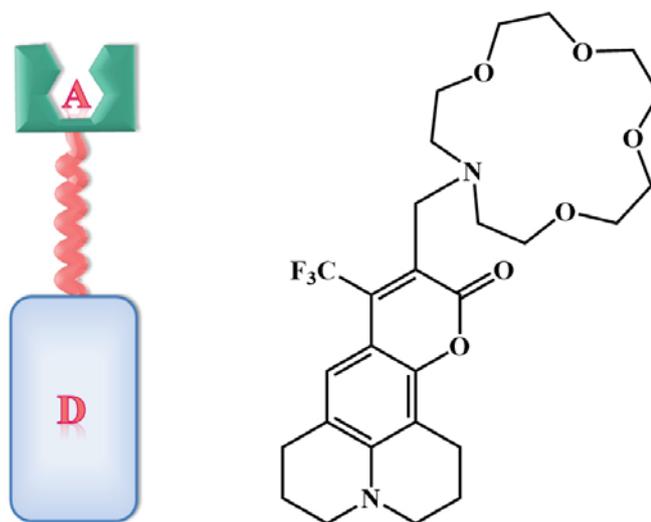


Figura 1.38. Quimiosensor en el que la unidad receptora tiene carácter electrón aceptor.

1.3.2.3. Por formación/desaparición de excímeros.

Muchos fluoróforos como el antraceno o el pireno son capaces de formar excímeros que de nuevo pueden ser dinámicos o estáticos.⁵³ El primer caso es el más común y aparece cuando un fluoróforo en el estado excitado se coloca espacialmente muy cerca de otro no excitado. En el segundo caso, la asociación entre dos fluoróforos se produce en el estado fundamental y a continuación ocurre la excitación de uno de ellos. Cuando la interacción se produce entre un fluoróforo en estado excitado y otra unidad aromática diferente en el estado fundamental se habla de formación de exciplejos. Esta clase de interacciones se observan en el espectro de emisión ya que además de la banda correspondiente al monómero, aparece una nueva banda a longitudes de onda mayores (hacia el rojo), ancha y carente de estructura (Figura 1.39).

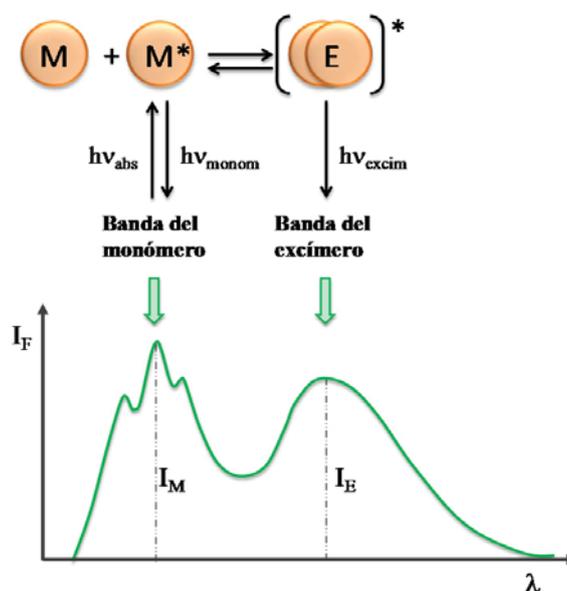


Figura 1.39. Espectro de emisión de fluorescencia que muestra las bandas correspondientes al monómero y al excímero.

Se ha comprobado, por el gran número de ejemplos que existen en la literatura, que la formación de excímeros es muy útil para el diseño de sensores fluorescentes. Si la distancia entre las unidades fluoróforas presentes en el quimiosensor se ve afectada por la coordinación del sustrato, el reconocimiento del mismo puede monitorizarse siguiendo la relación de intensidades de las señales de emisión del monómero y del excímero (figura 1.40).

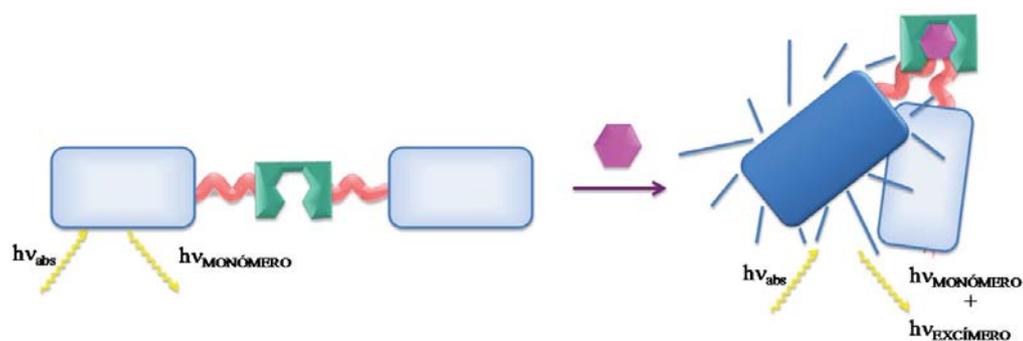


Figura 1.40. Formación de un excímero tras la interacción con un sustrato.

Sin embargo, el reconocimiento de un sustrato no es el único factor que puede alterar el comportamiento fotofísico del excímero. El sensor molecular fluorescente que se muestra en la figura 1.41 consta de una cadena poliamínica tripodal con tres unidades naftaleno en los extremos de las cadenas. En función de la temperatura es capaz de formar un intenso excímero intramolecular por lo que puede actuar como un termómetro molecular.⁵⁴

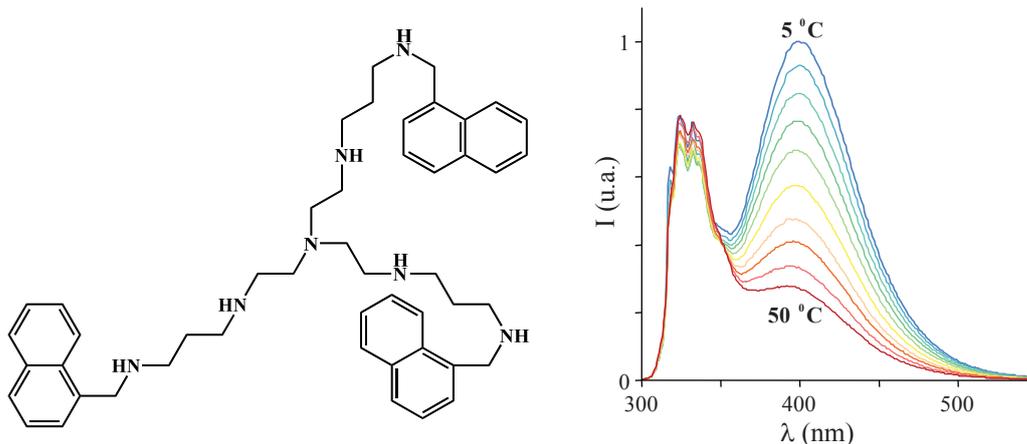


Figura 1.41. Esquema del ligando poliamínico (izquierda) y gráfica que muestra el aumento de la formación de excímero con la temperatura (derecha).

Una de las características más interesantes de este sistema es la posibilidad de regular la aparición del excímero variando la temperatura tal y como se muestra en la gráfica. Además, la emisión de fluorescencia se puede modular con la constante dieléctrica del medio y con el grado de protonación de los grupos amino presentes en las cadenas. Esto supone la posibilidad de usar tanto el pH como el disolvente para regular la respuesta de este sistema. Existen otros ejemplos en los que se ha modificado el medio en el que se encuentra la molécula orgánica para modificar la respuesta fluorescente del excímero, ya que su formación se puede modificar de forma drástica si los estudios se hacen en disolución acuosa o en geles.⁵⁵

A lo largo de las últimas páginas se ha mostrado un ejemplo práctico para cada tipo de proceso fotoquímico que puede darse durante el reconocimiento de un sustrato. Sin embargo, es necesario resaltar que estos procesos no son independientes y pueden combinarse entre sí. En el siguiente ejemplo desarrollado por Sakurai *et al.* se produce transferencia de carga fotoinducida junto con la formación de excímero (figura 1.42). El

quimiosensor se basa en la modificación de un azaéter corona con dos grupos pireno. La coordinación de un metal produce un aumento en la emisión debido a la reducción del proceso PET desde el átomo de nitrógeno a los grupos pireno y además, produce cambios en la relación de intensidades entre el monómero y el excímero. Se ha comprobado que la relación monómero/excímero depende en gran medida de la naturaleza del ión metálico. Entre los iones metálicos investigados, se obtuvieron las constantes de estabilidad más altas para los complejos con K^+ y Ba^{2+} , de acuerdo con el tamaño de estos cationes respecto al diámetro del éter.⁵⁶

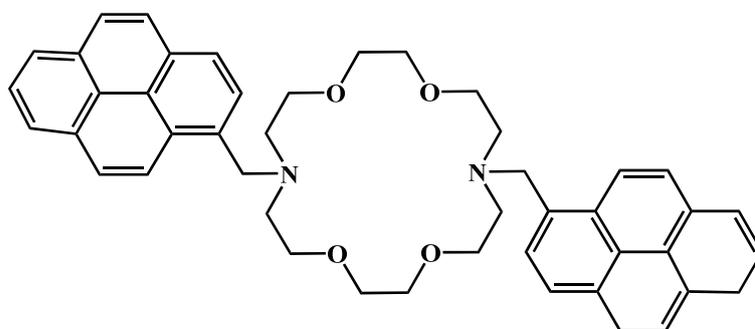


Figura 1.42. Estructura del quimiosensor que “sufre” PET junto con la formación de excímeros al coordinarse con cationes.

Aunque hasta el momento se han conseguido grandes e importantes avances en el campo del reconocimiento, el uso en los últimos años de arquitecturas más complejas u organizadas está permitiendo superar muchas de las limitaciones que aparecían al trabajar con los ligandos en disolución, como la baja fotoestabilidad de los fluoróforos, el bajo rendimiento cuántico de los mismos, la reducida solubilidad en agua y por tanto, la imposibilidad de trabajar en condiciones fisiológicas para realizar estudios *in vitro* e *in vivo*.

Debido a la necesidad de crear estructuras organizadas en las que los receptores se dispongan de manera ordenada y, que al mismo tiempo sirvan de vehículo o de plataforma para las moléculas activas en aplicaciones biomédicas, se ha producido un gran desarrollo en el área de los materiales. Estos nuevos sistemas se basan por ejemplo, en la introducción o el empleo de polímeros conjugados (CP), quantum Dots (QDs) y nanopartículas de sílice y oro dopadas con especies luminiscentes entre otros.⁵⁷

1.4. Sensores ópticos basados en materiales nanoestructurados.

El desarrollo de nuevos materiales híbridos orgánico-inorgánicos es uno de los campos más atractivos y emergentes dentro de la ciencia de materiales en los últimos años. No sólo es posible controlar el tamaño, la forma o el área superficial de los materiales nanoestructurados, sino que también se puede tener un control de la química interfacial, controlando las propiedades químicas y físicas superficiales del material. Gracias a una adecuada combinación entre los diferentes componentes que constituyen el entramado híbrido, se pueden conjugar las propiedades de cada uno de ellos de manera individual, e incluso en algunos casos, el material puede conferir propiedades adicionales o incluso amplificar la respuesta del sistema molecular.

Como se ha comentado en el apartado anterior, la fotoquímica ha atraído el interés de investigadores de diferentes campos tanto en el aspecto teórico como en la aplicación práctica. Por tanto, no es nada sorprendente el enorme desarrollo que está sufriendo este campo a lo largo de los últimos años. En particular, el interés se está desplazando desde el estudio de sistemas puramente moleculares hacia arquitecturas supramoleculares y,

más recientemente, hacia nanoestructuras donde las interacciones intermoleculares pueden conducir a dispositivos fotoquímicos funcionales de tamaño nanométrico.⁵⁸

La nanotecnología es una ciencia emergente que explota las propiedades y características únicas de diferentes materiales a escala nanométrica. En este contexto, las nanopartículas representan uno de los principales puntos de interés ya que estos sistemas tienen aplicaciones en diferentes campos como la electrónica, la optoelectrónica, la biomedicina, la catálisis y la ciencia de materiales.⁵⁹ En relación con la biomedicina, uno de los objetivos principales en el campo de las nanopartículas fotoactivas es el desarrollo de nanosistemas que puedan actuar como agentes de contraste biológico, participar en el diagnóstico médico y/o en el posterior tratamiento terapéutico (figura 1.43).

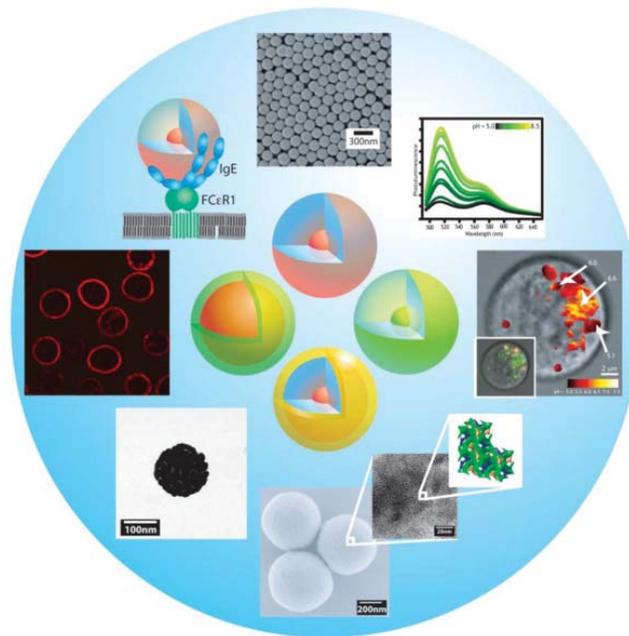


Figura 1.43. Visión general de las posibles aplicaciones de las nanopartículas.

Imagen tomada de ref. 59a.

1.4.1. Nanopartículas utilizadas en bioimagen y detección.

Hoy en día existen especies luminiscentes de naturaleza muy diversa. Entre las más usadas para aplicaciones biomédicas o dirigidas al campo de la detección se encuentran las orgánicas, organometálicas, poliméricas o proteicas.⁶⁰ Sin embargo, hay que destacar que en esta clase de aplicaciones los fluoróforos están expuestos a una gran variedad de ambientes agresivos y a menudo sufren desde fotodescomposición hasta una desactivación de la emisión de fluorescencia debido a la interacción con moléculas de disolvente y especies reactivas como el oxígeno o iones disueltos en la disolución. Debido a esto, el uso de fluoróforos para ensayos celulares *in vivo* tiene un gran número de limitaciones, por lo que es necesario buscar alternativas de cara a mejorar tanto su estabilidad como su sensibilidad.

Una posible estrategia para evitar estos inconvenientes es el uso de nanopartículas, ya que ofrecen un entorno protector donde las especies activas no se ven afectadas por agentes externos,⁶¹ de manera que son menos sensibles al medio que los rodea en comparación a los fluoróforos orgánicos aislados.⁶²

Las nanopartículas se pueden sintetizar variando su forma y tamaño de manera que tengan diferentes relaciones superficie-volumen, y una vez modificadas con las moléculas de interés, se puede optimizar la relación señal/ruido de manera que sea comparable a la obtenida con las moléculas orgánicas libres. Se pueden funcionalizar de manera que la detección de sustratos se realice tanto por técnicas de espectroscopía de fluorescencia como UV-visible.

Una de las aplicaciones más desarrolladas en los últimos años se basa en el empleo de nanopartículas para diagnóstico y tratamientos de enfermedades, ya que se pueden modificar con fármacos y biomoléculas de interés farmacológico como anticuerpos, proteínas, etc.⁶³ Estas nanopartículas funcionalizadas con el fármaco incluso se pueden dirigir de forma selectiva al lugar de acción mediante la incorporación a la propia nanopartícula de anticuerpos, con lo que además de hacer más eficaz la llegada del fármaco, se le protege de posibles degradaciones en el organismo.⁶⁴ La figura 1.44 esquematiza la versatilidad de estos sistemas resumiendo un conjunto de propiedades deseables en una nanopartícula multifuncional.⁶⁵

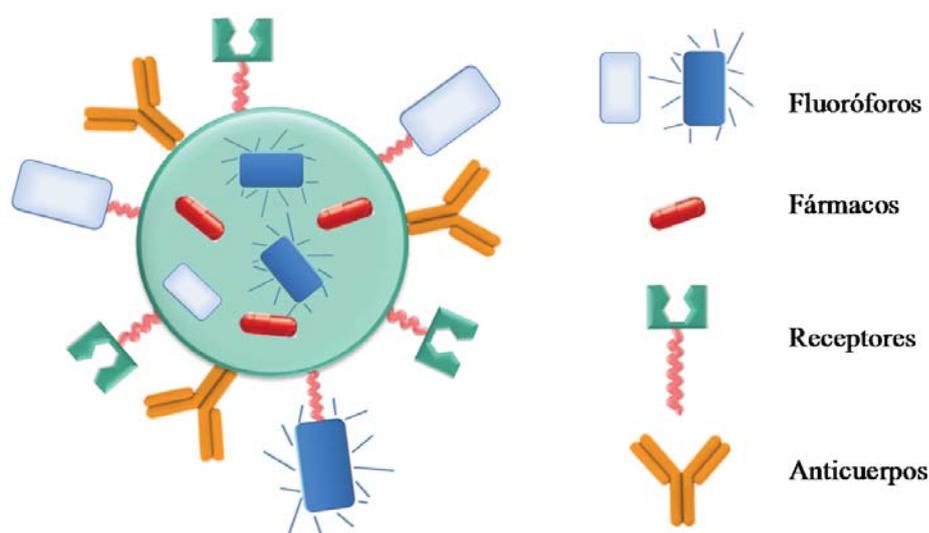


Figura 1.44. Diseño de una nanopartícula multifuncional que consta de unidades receptoras, unidades señalizadoras, fármacos y anticuerpos.

El uso de nanopartículas en la síntesis de quimiosensores luminiscentes híbridos tiene que cumplir ciertos requisitos básicos. El material debe ser químicamente estable, compatible con el medio en el que se va a usar, y debe presentar propiedades fotofísicas que no dependan del entorno o de un analito específico. Si se buscan fines comerciales, la

síntesis debe ser sencilla y los materiales de partida deben tener un bajo coste y por último, en el caso de aplicaciones médicas es muy importante que sean biocompatibles.⁶⁶

En la figura 1.45 se recogen varios ejemplos de sistemas sólidos que pueden emplearse en el diseño de sistemas híbridos fluorescentes: nanopartículas, superficies, nanotubos, etc. Cada uno de ellos tiene sus ventajas e inconvenientes según la finalidad que se busque, por lo que a continuación se presenta una breve descripción de ellos haciendo más hincapié en los que serán utilizados en la presente memoria de tesis.

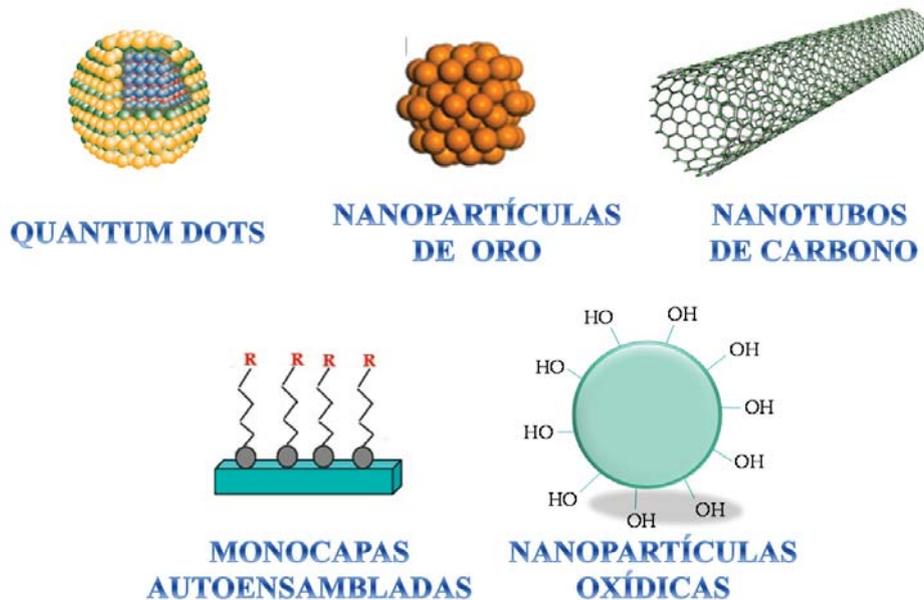


Figura 1.45. Tipos de soportes.

1.4.1.1. Quantum dots.

Los sistemas llamados quantum dots (QDs) se desarrollaron a principios de 1970. Estos clusters atómicos se definen como heteroestructuras luminiscentes de escala nanométrica (1.5-12 nm), que

contienen desde unos cientos a unos miles de átomos de un material semiconductor como el CdSe, CdS, InP o InAs. Estas nanopartículas se pueden recubrir de una capa adicional de sulfuro de zinc para mejorar sus propiedades ópticas como el brillo o la fotoestabilidad. Se ha comprobado que en los materiales con arquitectura núcleo-envoltura (*core-shell*) los procesos de fotodescomposición de la unidad emisiva se evitan en gran medida.

Las propiedades ópticas de los QDs son muy características: emiten en un intervalo de emisión estrecho, tienen un coeficiente de extinción molar (ϵ) y un rendimiento cuántico (Φ) alto, presentan tiempos de vida elevados y, en comparación con las moléculas orgánicas fluorescentes típicas, tienen una estabilidad alta.⁶⁷ Además, la energía de los estados excitados depende no sólo del material que los compone, sino también del tamaño de partícula como se puede ver en la figura 1.46.

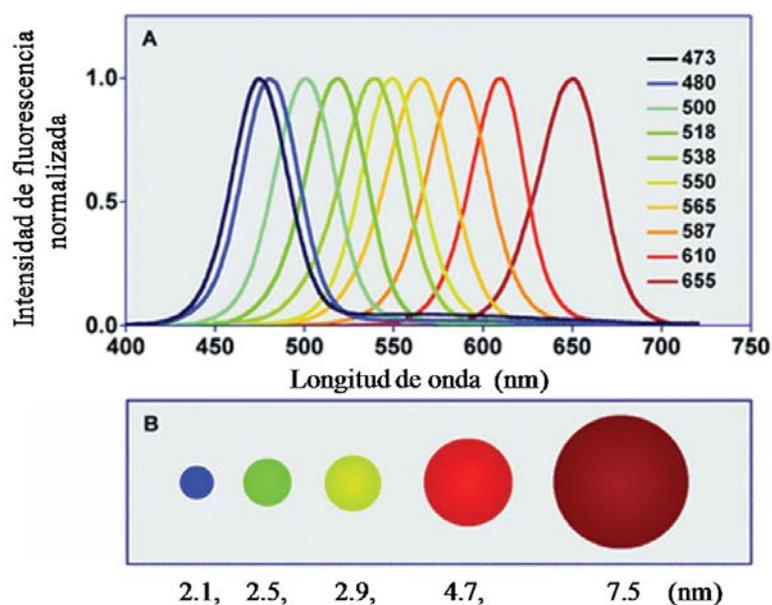


Figura 1.46. Emisión de fluorescencia de *quantum dots* de CdSe (A), e ilustración de la dependencia del tamaño con la emisión (B).

A pesar de las propiedades ópticas descritas anteriormente, los QDs presentan una gran desventaja frente a otros sistemas, y es que no se dispersan bien en agua, lo que imposibilita su aplicación en medios totalmente acuosos. Se está trabajando en la modificación de la capa superficial para hacerlos solubles en agua, facilitando así su conjugación con biomoléculas y permitiendo su aplicación en técnicas de bioimagen.⁶⁸ Aunque es cierto que existen diferentes métodos para hacer biocompatibles a estos sistemas e incluso para introducir cierta especificidad en los grupos de unión⁶⁹ (muchos trabajos han sido publicados exponiendo el uso de QDs como herramienta para el diagnóstico *in vitro* e *in vivo*), existen algunos inconvenientes a la hora de expandir o comercializar su uso, siendo quizá el más importante, su citotoxicidad. Uno de los elementos más abundantes en estos nanocristales es el cadmio, del que se conoce perfectamente su toxicidad, por lo que es crítico conocer si puede liberarse de los QDs con el paso del tiempo, al irradiarlas o al sufrir procesos de oxidación. De hecho, existe cierta controversia sobre la citotoxicidad de estos sistemas ya que mientras es posible encontrar trabajos donde no se ha observado,⁷⁰ existen ejemplos (más numerosos) que demuestran la toxicidad de estos sistemas.⁷¹ En los últimos años, se ha trabajado extensamente en superar estas limitaciones⁷² y varios ejemplos de QDs biocompatibles basados en procesos FRET han aparecido en la bibliografía.⁷³

1.4.1.2. Nanopartículas de oro.

Alrededor de 1920 surgieron varios métodos para la preparación de las primeras nanopartículas de oro (AuNPs) coloidales⁷⁴ y de entre todos ellos, cabe destacar el método desarrollado por Brust y Schiffrin⁷⁵ en 1994,

ya que supuso la síntesis por primera vez de nanopartículas de oro de tamaño controlado y homogéneo estables al aire y a la temperatura.

Las nanopartículas de oro muestran una banda de absorción intensa en la zona visible del espectro electromagnético que se conoce como banda de plasmón de superficie (SPB), responsable de que las disoluciones que contienen nanopartículas de oro tengan un color rojo intenso. La SPB es debida a la oscilación colectiva de los electrones móviles en la superficie de las nanopartículas, que se produce por el campo electromagnético de la luz incidente, y que ha sido descrita por la teoría de Mie⁷⁶ y estudiada por muchos autores. El máximo de la SPB y la anchura de la banda se ven influenciadas por una serie de factores como son el tamaño y la forma de la partícula, el disolvente, la temperatura, la morfología de los agregados, la funcionalización de la superficie, las propiedades dieléctricas, y el índice de refracción del medio.⁷⁷

Estos desplazamientos de la SPB pueden aplicarse de manera muy interesante al campo de los sensores ópticos de iones, moléculas o macromoléculas.⁷⁸ Así por ejemplo, se han utilizado nanopartículas de oro modificadas superficialmente con éteres corona en la detección colorimétrica de potasio. La coordinación de los cationes potasio por los éteres corona pertenecientes a diferentes nanopartículas provoca una agregación de las mismas, dando lugar a un cambio de coloración desde el rojo al azul.⁷⁹ En la figura 1.47 se esquematiza el proceso de coordinación y los cambios ópticos que lleva asociado la detección catiónica. La elevada sensibilidad de este sensor colorimétrico hacia K^+ en agua es probablemente debida por un lado, a la cooperatividad de los éteres corona situados en la superficie de las nanopartículas, y por otro a las atracciones interpartícula por fuerzas de van der Waals (que son especialmente fuertes

entre las nanopartículas de oro por la elevada polarizabilidad de los núcleos metálicos).

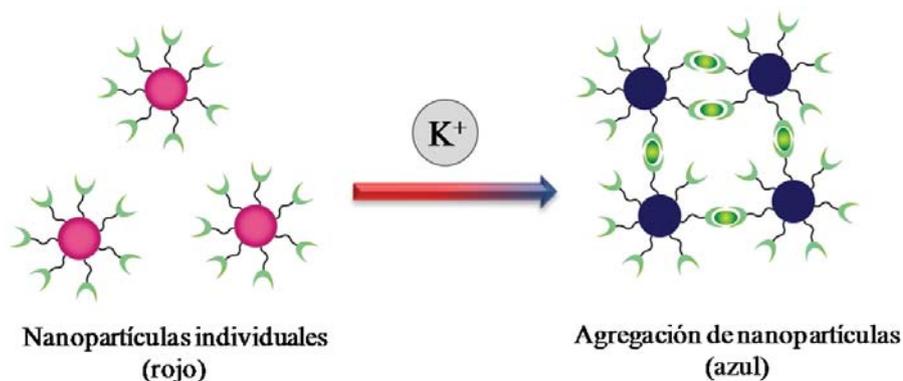


Figura 1.47. Agregación de nanopartículas de oro individuales (izquierda) debida a la coordinación de potasio induce un desplazamiento de la SPB hacia el rojo (derecha).

Las disoluciones coloidales de nanopartículas de oro muestran algunas ventajas frente a los QDs ya que no sufren procesos de fotodescomposición, no son intrínsecamente tóxicas (de hecho el oro es uno de los pocos metales que no es rechazado por el cuerpo humano, si bien la acumulación de oro sí produce toxicidad con el tiempo), son razonablemente estables y pueden almacenarse siempre que sea en un ambiente seco. Sin embargo, en cuanto a propiedades luminiscentes se pueden encontrar algunas desventajas, ya que en principio las nanopartículas de oro pueden inhibir la emisión de fluorescencia de los fluoróforos situados en la superficie de la nanopartícula.⁸⁰ Además, se ha demostrado que las velocidades de los procesos radiativos y no radiativos dependen de manera crítica del tamaño, la forma de las nanopartículas, la distancia entre los fluoróforos presentes en la superficie, la orientación del dipolo respecto del eje fluoróforo-nanopartícula y el solapamiento entre el espectro de absorción del fluoróforo y de las propias nanopartículas.^{80b, 81,82}

Es importante tener en cuenta la gran variedad de factores que afectan a la luminiscencia a la hora de trabajar con este tipo de nanopartículas en el diseño de quimiosensores híbridos.

1.4.1.3. Nanotubos de carbono.

Aunque los nanotubos de carbono (CNTs) no son estrictamente sistemas nanoparticulados, sí entran dentro de la clasificación de sistemas nanoestructurados con una gran superficie disponible para su modificación. Fueron descubiertos en Japón por S. Iijima en 1991 en el transcurso de su trabajo de investigación sobre fullerenos.⁸³ Los nanotubos de carbono están constituidos por redes hexagonales de carbono curvadas y cerradas formando tubos de tamaño nanométrico, con una serie de características que han despertado un gran interés en numerosas aplicaciones tecnológicas. Una de sus propiedades más interesantes es la alta capacidad de emisión de electrones, lo que se ha utilizado para fabricar fuentes de electrones para microscopios electrónicos. Debido a estas características, el grafeno está siendo utilizado como soporte en la fabricación de biosensores.

Un ejemplo del uso de nanotubos de carbono en el campo de los biosensores se muestra en la figura 1.48. Una monohebra de ADN modificada en la posición 3' con una molécula de fluoresceína se encuentra interaccionando con la superficie del nanotubo de carbono, de manera que la emisión de fluorescencia está desactivada. Cuando se adiciona la secuencia de oligonucleótidos complementaria a la fibra que se encuentra en la superficie del nanotubo, se produce la hibridación entre las secuencias

de oligonucleótidos complementarias, liberando el nanotubo a la disolución y recuperando la emisión de la fluoresceína.

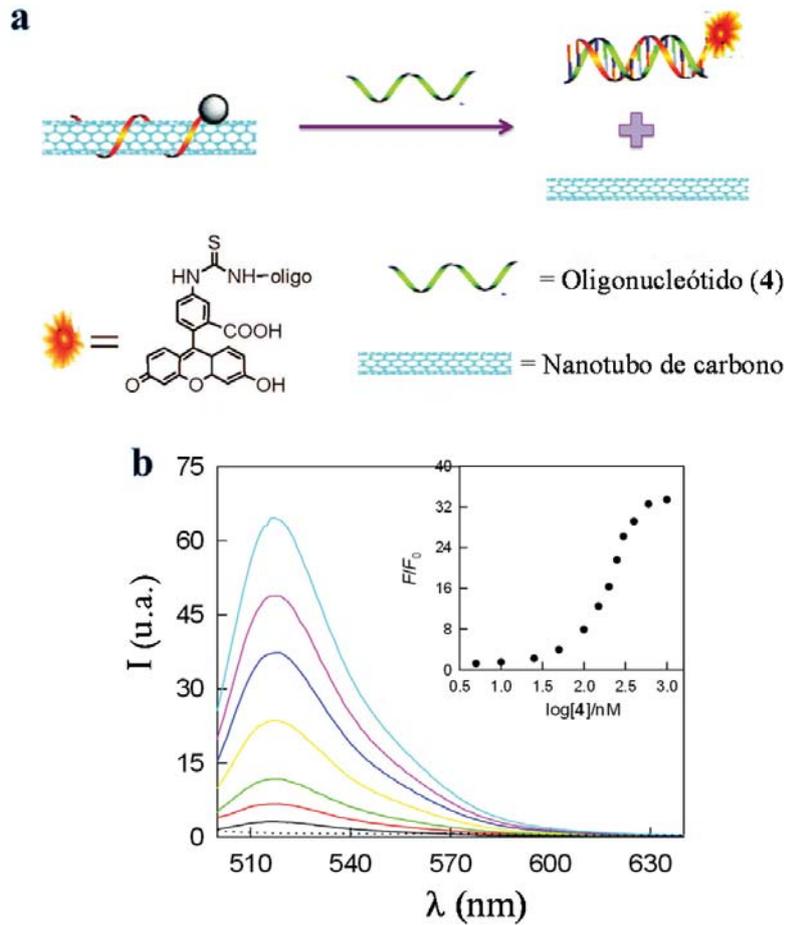


Figura 1.48. a) Esquema del ensayo de desplazamiento. b) Ensayo de desplazamiento del sistema oligonucleótido-3' fluoresceína sobre el CNT (línea discontinua) al adicionar cantidades crecientes de oligonucleótido complementario (4). Miniatura: máximo de emisión correspondiente a la fluoresceína frente a la concentración de 4.

1.4.1.4. Monocapas autoensambladas sobre superficies de vidrio.

Las monocapas autoensambladas (SAMs) son conjuntos moleculares formados espontáneamente en la superficie de un vidrio por adsorción, lo que provoca que las moléculas no se encuentren dispuestas de manera homogénea sobre la superficie, sino organizadas en dominios ordenados de diferentes tamaños. El soporte que se emplea en estos sistemas no posee dimensiones controlables a escala nanométrica, pero implica de igual modo un autoensamblaje de monocapas moleculares sobre una superficie lo que también puede dar lugar a la aparición de efectos colectivos.⁸⁴ Así por ejemplo, en un trabajo de Crego-Calama y Reinhoudt se describe la detección mediante fluorescencia de cationes metálicos en la superficie de una SAM en vidrio sin necesidad de que la subunidad emisora incorpore un receptor específico para los cationes.⁸⁵ Sin embargo, estos sistemas tienen la desventaja de que presentan una superficie muy pequeña, mientras que en el caso de las nanopartículas la superficie específica es mucho mayor, lo que permite incorporar un mayor número de ligandos, y por tanto obtener una mayor sensibilidad en la respuesta.

1.4.1.5. Óxidos Inorgánicos.

Uno de los sistemas más desarrollados para su empleo como materiales luminiscentes son las nanopartículas de óxidos inorgánicos: magnetita, sílice, aluminosilicatos, etc. Estos sistemas han mostrado un gran número de ventajas frente al uso tradicional de moléculas fluorescentes tanto en el diseño de biosensores,⁸⁶ inmunoensayos,⁸⁷ análisis de ácidos nucleicos,⁸⁸ liberación de fármacos⁸⁹ o terapia genética.⁹⁰

Existen diferentes métodos sintéticos para la preparación de esta clase de nanopartículas y en particular para la síntesis de nanopartículas dopadas con moléculas fluorescentes, todas ellas caracterizadas por su simplicidad, bajo coste, versatilidad, y sobre todo por la capacidad de controlar la arquitectura de los materiales resultantes. La habilidad para controlar la disposición espacial de los componentes moleculares fluorescentes es, de hecho, una condición esencial para diseñar sistemas capaces de llevar a cabo funciones específicas con una alta eficiencia sin perder energía de excitación en procesos parásitos.

A la hora de preparar quimiosensores nanoestructurados existen varias estrategias posibles de síntesis dependiendo de si el receptor y la unidad fluorescente se encuentran o no unidos covalentemente.⁶⁶ También es posible modificar la molécula orgánica con un grupo trietoxisilano por ejemplo, de manera que forme parte de la propia estructura del óxido inorgánico⁹¹ o que se una a la superficie externa de la nanopartícula.⁹² Todo esto permite desarrollar cinco tipos diferentes de nanoestructuras:

- el quimiosensor se encuentra incluido en el interior de la nanopartícula (figura 1.49a).
- el quimiosensor se encuentra unido a la superficie de la nanopartícula (figura 1.49b).
- el receptor se encuentra en la superficie y la unidad señalizadora se encuentra en el interior de la nanopartícula (figura 1.49c).
- el receptor y la unidad señalizadora se encuentran separados en el interior de la nanopartícula (figura 1.49d).
- el receptor y la unidad señalizadora se encuentran separados en la superficie de la nanopartícula (figura 1.49e).

Todas estas posibilidades no muestran ni las mismas propiedades ni se comportan igual, por lo que tienen diferentes ventajas e inconvenientes según la aplicación final que se desea. Por ejemplo, la estabilidad química de las moléculas orgánicas frente a agentes externos agresivos aumenta cuando las especies fluorescentes se encuentran segregadas en el interior, ya que de algún modo se encuentran protegidas. Sin embargo, la accesibilidad del sustrato a las unidades receptoras es menor.⁹³ Por otro lado, cuando las especies receptoras se encuentran en la superficie, la detección se ve favorecida, ya que están más “cerca” del sustrato y su movilidad es mayor. Esto conlleva un incremento en las interacciones electrónicas que pueden en algunos casos, conseguir un efecto de amplificación de la señal⁹⁴ y un incremento en las constantes de complejación.

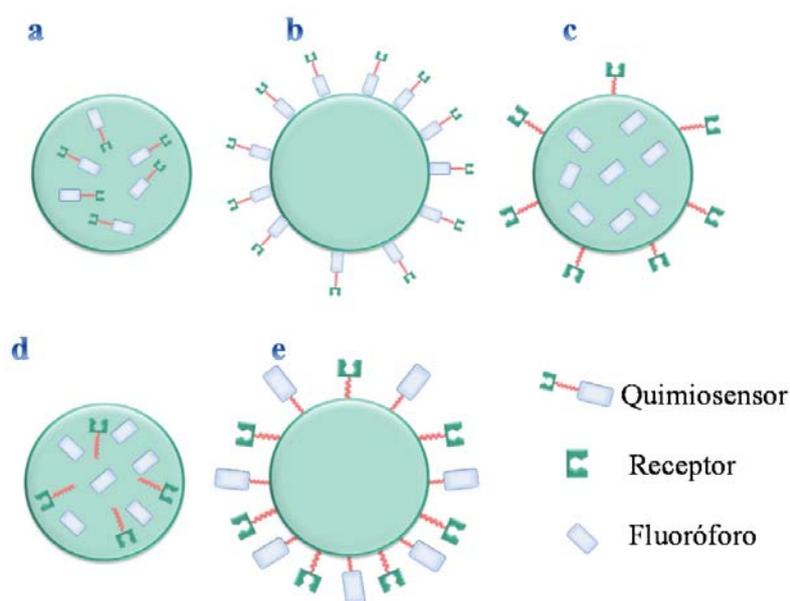


Figura 1.49. Diferentes aproximaciones en el diseño de nanopartículas luminiscentes.

Ser capaz de optimizar estas estructuras en función de la aplicación que quiera darse a los sistemas es muy importante, poniendo especial

esfuerzo en el entorno y la movilidad del receptor tanto como en el nivel de comunicación deseado entre las diferentes unidades. A continuación se van a mostrar varios ejemplos con las diferentes posibilidades descritas en la figura 1.49 según la aplicación deseada.

1.4.1.5.1. Quimiosensor en la superficie.

Si la aplicación final de nuestro sistema es que forme parte de un quimiosensor, la modificación superficial de las nanopartículas con un sistema multicromofórico parece ser la posibilidad más prometedora. Las unidades activas se pueden disponer en la superficie con un alto grado de organización, de manera que se consigue una densidad local de moléculas elevada y por tanto se puede llegar a obtener una amplificación de la señal.

Un ejemplo del empleo de esta estrategia a la hora de diseñar un quimiosensor fluorescente de Zn(II) es el desarrollado por L. Prodi *et al.*⁹⁵ en el que se modifica la superficie de nanopartículas de sílice con una quinolinasulfonamida modificada con un grupo trietoxisilano (QST) (figura 1.50). En este sistema, la complejación tiene lugar junto con la desprotonación del grupo sulfonamídico, lo que se traduce en un desplazamiento hacia el rojo de la banda de absorción y un aumento de la intensidad de emisión de fluorescencia, debido a una transferencia de carga interna en los complejos Zn(II)QST y Zn(II)(QST)₂.

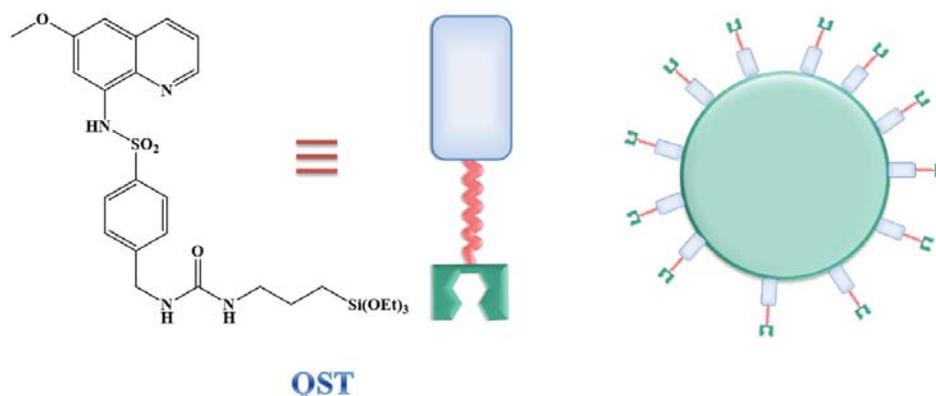


Figura 1.50. Esquema del quimiosensor orgánico y disposición en la nanopartícula.

En este sistema se ha observado un efecto de amplificación de la respuesta fluorescente gracias a la preorganización de las moléculas orgánicas en la superficie de una nanopartícula (figura 1.51). En ausencia de Zn(II), la desactivación desde los estados excitados del QST se produce mayoritariamente a través de un proceso no radiativo (flechas azules discontinuas) ya que el proceso radiativo no es eficaz. Sin embargo, cuando se añade una cantidad de Zn(II) suficiente para empezar a formar complejos 1:1, tiene lugar la emisión radiativa mediante fluorescencia (flecha continua azul).

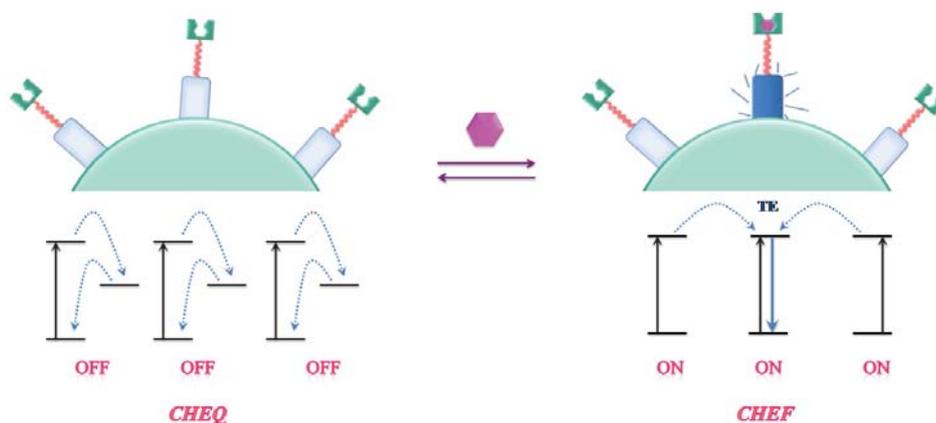


Figura 1.51. Esquema de los cambios fotoquímicos tras la complejación con Zn(II) a bajas concentraciones.

Se ha observado una amplificación de la señal de hasta un 50% con respecto al sistema de referencia QST (no situado en la superficie de las nanopartículas) en las mismas condiciones experimentales, debido a que la energía de excitación de las unidades QST adyacentes es transferida a los estados excitados de las unidades que se encuentran coordinadas al metal. Sin embargo, estos resultados tan positivos, vienen acompañados de cambios de solubilidad sustanciales ya que el sistema híbrido sólo se puede disolver de manera eficaz en DMSO, por lo que es importante elegir un material que, aunque sea fotoquímicamente inerte, potencie o por lo menos no impida la solubilidad del sistema en disolventes acuosos.

Existen otros ejemplos que hacen referencia a un aumento en la respuesta luminiscente por el hecho de organizar a los receptores en la superficie de nanopartículas, lo que supone una gran ventaja frente al uso de los quimiosensores libres en disolución.⁹⁶

1.4.1.5.2. Unidad fluorófora y receptora separadas en la superficie.

Esta aproximación se basa en la autoorganización del fluoróforo y del receptor mediante el uso de una plantilla adecuada para formar un ensamblaje organizado de ambos. En este caso las diferentes unidades no interactúan de manera directa y como consecuencia, la comunicación entre el sustrato unido al receptor y el fluoróforo se garantiza sólo por su disposición espacial más o menos cercana. Por supuesto, es necesario diseñar el quimiosensor de manera que el reconocimiento del sustrato por parte del receptor se traduzca en una modificación de las propiedades emisivas del fluoróforo. En los últimos años, se han empleado diferentes tipos de materiales como plantillas para guiar la autoorganización de los

quimiosensores, desde el uso de agregados micelares,⁹⁷ monocapas de Langmuir-Blodgett,⁹⁸ o la organización de capas de trialcoxisilano sobre superficies de vidrio.⁹⁹

A continuación se muestra un ejemplo del efecto plantilla en las propiedades finales del híbrido como quimiosensor (figura 1.52).¹⁰⁰ En él se autoorganiza el receptor, una picolinamida, y la unidad señalizadora, un grupo dansilamida, en la superficie de nanopartículas de sílice de unos 20 nm de diámetro.

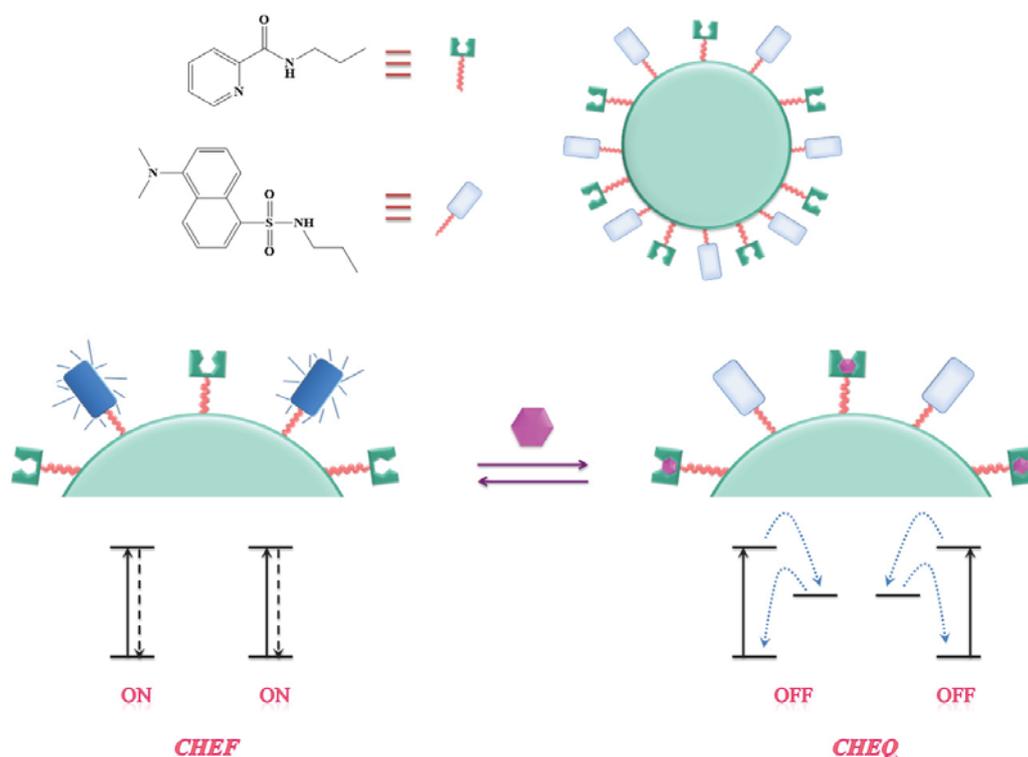


Figura 1.52. Nanopartículas funcionalizadas para la detección de cobre.

La unión de los componentes del quimiosensor a la superficie a través de los grupos trialcoxisilano presentes en su estructura química, asegura su proximidad espacial, lo que resulta en un material híbrido capaz de detectar selectivamente Cu(II) a través de la desactivación de la emisión

de fluorescencia del grupo dansilo por debajo de concentraciones de orden micromolar.

Sin embargo, la aplicación real de estos sistemas es reducida debido a sus importantes limitaciones. En particular, los agregados formados a partir de surfactantes y las películas de Langmuir-Blodgett son objetos delicados que se forman sólo en condiciones particulares. Por otro lado, las superficies de vidrio tienen un área superficial reducida que no permite la generación de una fuerte señal de fluorescencia. De nuevo, los sistemas nanoparticulados se presentan como una alternativa eficaz ya que la organización tanto de subunidades activas como de fluoróforos en su superficie no conlleva las limitaciones previamente descritas.¹⁰¹

1.4.1.5.3. Unidad fluorófora en el interior y receptora en la superficie.

En general, los quimiosensores basados en iones lantánidos han atraído el interés de la comunidad científica durante varias décadas debido a sus características fotofísicas únicas como tiempos de vida elevados, bandas de emisión estrechas y altos desplazamientos de Stokes. Como ejemplo de ello, se encuentran los trabajos desarrollados para la detección de dipicolinato de calcio (CaDPA). Esta sustancia muestra una gran afinidad por los iones lantánidos y en particular por el terbio(III). La importancia de detectar esta sustancia radica en que es el único biomarcador de las esporas de bacilos como el *B. anthracis*, conocido como un agente potencial en los ataques terroristas biológicos.

L. Lu *et al.* publicaron en 2009 un estudio muy interesante basado en la modificación de nanopartículas con un complejo de Eu(III) como

quimiosensor.¹⁰² El sistema híbrido está formado por nanopartículas de sílice dopadas en su interior con un derivado de la fluoresceína (FITC). A continuación la superficie se modificó con dianhídrido de etilendiaminotetracético (EDTAD) que se transforma *in situ* en el complejo de europio mediante la reacción con EuCl_3 (figura 1.53).

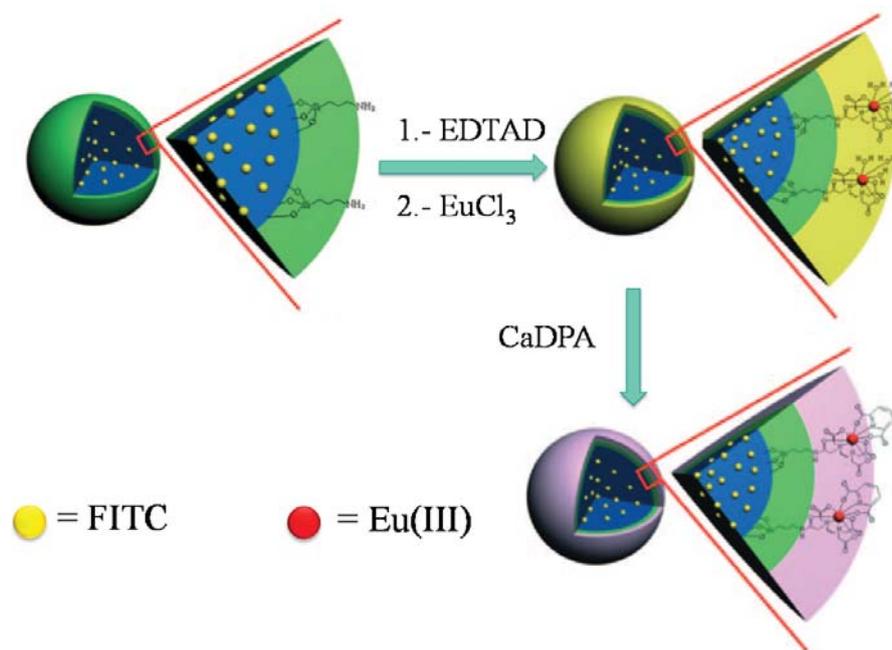


Figura 1.53. Estrategia de síntesis de un quimiosensor híbrido basado en un complejo de europio.

En el complejo el lantánido está coordinado a 3 moléculas de agua que favorecen la desactivación de la emisión de fluorescencia mediante un proceso no radiativo. Sin embargo, estas moléculas de agua se encuentran débilmente unidas al centro metálico y pueden ser sustituidas por DPA cuando éste se encuentra en la disolución, lo que se traduce en un aumento significativo de la emisión del complejo. Los autores encontraron una correlación lineal entre el máximo de intensidad en la emisión del quimiosensor y la concentración de CaDPA en el intervalo de concentraciones entre 0.6-600 nM, con un límite de detección por debajo de

0.2 nM. La detección rápida y eficaz de las esporas *B anthracis* en agua se vio potenciada debido a que este sistema es de naturaleza ratiométrica: la emisión de la fluoresceína presente en el interior de la nanopartícula se emplea como referencia, ya que no se ve afectada de ninguna manera por la presencia del CaDPA.

1.4.1.5.4. Quimiosensor en el interior de la nanopartícula.

En base a esta estrategia K. Wang *et al.* diseñaron un sistema capaz de detectar variaciones de pH en un intervalo entre 4 y 7 en macrófagos murino y en células cancerígenas humanas vivas (células Hela) durante la apoptosis.¹⁰³ Para ello, sintetizaron nanopartículas de sílice con un diámetro medio de 42 nm, que contenían en su interior un derivado de la fluoresceína silanizada que actuaba como quimiosensor, y un derivado de rutenio (tris(2,2'-bipyridyl)rutenio (II)) como referencia interna (figura 1.54). Después de investigar la estabilidad y la fotoestabilidad del sistema, se incubaron las nanopartículas modificadas con macrófagos murinos, y se monitorizaron los cambios en el pH lisosomal en tiempo real después de exponerlos a cloroquinina y droga antimalaria. La comparación entre las variaciones de la intensidad de fluorescencia de la fluoresceína y del complejo de rutenio para las muestras de referencia y para las muestras a las que se ha añadido diferentes cantidades de droga, muestran como la cloroquinona estimula cambios en el pH lisosomal que pueden ser detectados con una gran sensibilidad mediante este método. Los resultados obtenidos para las células Hela demuestran que mediante este sistema híbrido es posible detectar la acidificación intracelular en células cancerígenas apoptóticas en tiempo real con una respuesta menor a 1

segundo. Además, el sistema presenta buena reproducibilidad y una alta estabilidad.

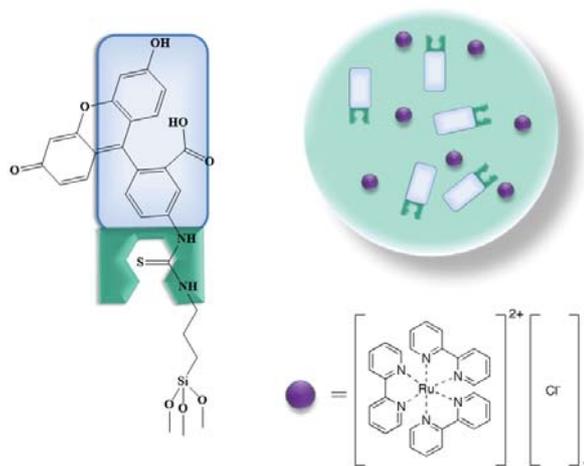


Figura 1.54. Diseño de un quimiosensor híbrido para detectar cambios en el pH lisosomal.

1.4.1.6. Nanopartículas con estructura núcleo-envoltura de sílice.

Como última estrategia en el diseño de quimiosensores híbridos, se quiere incluir la familia de materiales diseñados con una arquitectura núcleo-envoltura (*core-shell*). Este tipo de materiales consisten en un núcleo interno con una composición química determinada y una capa externa de otra diferente. Esta característica estructural abre la posibilidad de combinar diferentes materiales y por lo tanto diferentes propiedades en una misma entidad. A finales de los años 80, cuando se descubrió que las propiedades semiconductoras de los materiales heterogéneos eran mejores que las correspondientes a los componentes de manera,¹⁰⁴ se produjo un gran desarrollo en la investigación de la síntesis de nanopartículas semiconductoras multicapa, y fue entonces cuando surgió el término núcleo-envoltura.¹⁰⁵

Esta clase de sistemas se caracterizan por la disposición en forma de multicapa de diferentes materiales, pero tanto la disposición como la naturaleza de estos dependen en gran medida de la aplicación final. En la figura 1.55 se puede ver el esquema de diferentes tipos de nanopartículas: esféricas (a), hexagonales (b), núcleos nanoparticulados con una única envoltura (c), nanopartículas multicapa concéntricas (d) o, núcleos situados en cavidades generadas por la envoltura (e). De la misma forma, dependiendo de la naturaleza del material, se pueden encontrar diferentes combinaciones núcleo-envoltura como: inorgánico-inorgánico, orgánico-inorgánico, inorgánico-orgánico u orgánico-orgánico.

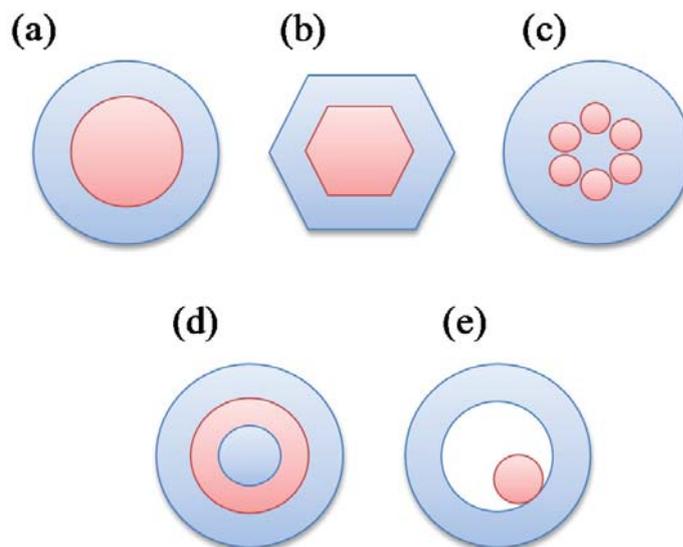


Figura 1.55. Diferentes estructuras en las nanopartículas con arquitectura núcleo-envoltura.

La elección del material que compone la envoltura es de gran importancia debido a la posibilidad de modificación de la superficie y por tanto, la ampliación de la funcionalidad, la estabilidad, la dispersión en disolución, etc del material final. En este sentido, uno de los materiales

más empleados es la sílice ya que se obtiene a través de una síntesis sencilla, es biocompatible y ofrece la posibilidad de modificarla.¹⁰⁶

1.5. Motivación de la presente tesis doctoral.

A lo largo de la introducción de esta tesis se ha pretendido mostrar la importancia que tienen las interacciones supramoleculares en el reconocimiento de sustratos de diferente naturaleza. Además, y avanzando en el diseño de estructuras cada vez más organizadas y eficaces, se ha introducido el empleo de materiales nanoestructurados para la síntesis de nanosensores con aplicaciones muy diversas.

Con el fin de contribuir al desarrollo de este campo se van a aplicar los conocimientos adquiridos en la síntesis de nanopartículas oxídicas de bohemita y de bohemita-sílice para obtener diferentes materiales híbridos, capaces de reconocer sustratos catiónicos y aniónicos en disolución acuosa mediante el uso de interacciones no covalentes. Además, se va a emplear la luminiscencia como herramienta de señalización de los procesos de reconocimiento, debido al gran número de ventajas que se han expuesto anteriormente.

1.5. Bibliografía.

- [1] J.-M Lehn, *Supramolecular Chemistry*, Ed. VCH, 1995.
- [2] J.-M Lehn, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1988, 27, 89.
- [3] F. Reviriego, A. Sanz, P. Navarro, J. Latorre, E. García-España, M. Liu-González, *Org. Biomol. Chem.*, 2009, 7, 3212.
- [4] J.-M. Lehn, Nobel Lecture: *Supramolecular Chemistry - Scope and Perspectives: Molecules - Supramolecules - Molecular Devices*. Nobelprize.org. Nobel Media AB 2014, 2015.
- [5] E. Fischer, *Chem. Ges. Ber.*, 1894, 27, 2985.
- [6] D. E. Koshland, *PNAS*, 1958, 44, 98.
- [7] a) J.-M Lehn, *Science*, 1985, 227, 849. b) C. A. Hunter, *Angew. Chem., Int. Ed.* 2004, 43, 5310. c) J. P. Glusker, *Top. Curr. Chem.* 1998, 198, 1. d) K. Szalewicz, K. Patkowski, B. Jeziorski, *Struct. Bonding* 2005, 116, 43. e) A. E. Reed, L. A. Curtiss, F. Weinhold, *Chem. Rev.* 1988, 88, 899. f) P. Hobza, R. Zahradnik, *Chem. Rev.*, 1988, 88, 871. g) N. Nandi, D. Vollhardt, *Acc. Chem. Res.*, 2007, 40, 351. h) A. Krushelnitsky, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2006, 8, 2117. i) H. J. Schneider, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1991, 30, 1417.
- [8] J. M. Lehn, *Pure Appl. Chem.*, 1978, 50, 871
- [9] P. Ballester, A. Vidal-Ferran, *Introduction to Supramolecular Catalysis*, in *Supramolecular Catalysis*, ed. P. W. N. M. van Leeuwen, Wiley-VCH, Weinheim, 2008.
- [10] A. Bianchi, K. Bowman-James, E. García-España, *Supramolecular Chemistry of Anions*, Wiley-VCH, New York, 1997.
- [11] J.-M Lehn, *Angew. Chem.*, 1988, 100, 91. b) J. S. Bradshaw, R. M. Izatt, A. V. Bordunov, C. Y. Zhu, J. K. Hathaway, *Compr. Supramol. Chem.*, 1996, 1, 35. c) D. K. Cabbiness, D. W. Margerum, *J. Am. Chem. Soc.* 1969, 91, 6540. d) J.-M Lehn, *Acc. Chem. Res.*, 1978, 11, 49.
- [12] M. Kodama, E. Kimura, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1976, 2941.

[13] a) D. J. Cram, *From Design to Discovery*, American Chemical Society, Washington DC, 1991. b) E. Maverick, D. J. Cram, *Compr. Supramol. Chem.* 1996, 1, 213.

[14] a) C. Lodeiro, F. Pina, *Coord. Chem. Rev.*, 2009, 253, 1353. b) A. P. de Silva, D. B. Fox, T. S. Moody, S. M. Weir, *TRENDS in Biotechnology*, 2001, 19, 29.

[15] a) D. Bryce-Smith, *Photochemistry*, 1985, 15. b) R. B. Cundall, A. Gilbert, *Photochemistry*, 1970. c) A. Gilbert, Editor, *Photochemistry*, 1997, 28.

[16] B. Valeur, *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, Wiley-VCH, Verlag, GmbH, 2001.

[17] a) T. N. J., Kleinman M. H., Karatekin E., *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2000, 39, 4437. b) V. Buenau G., Wolff T., *Photochemistry: Principle, Methods, and Applications*, 1987.

[18] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer, 3rd ed, 2006.

[19] Aunque normalmente se hace referencia a este diagrama como el diagrama Jablonski, merece hacer referencia a que fueron Jean y Francis Perrin los primeros en hablar sobre un estado metaestable entre el estado fundamental y los estados excitados de los fluoróforos. Propusieron que la activación térmica de este estado era la causa de la aparición de una fluorescencia tardía [Perrin F. *Ann. Phys.* 12,169,1929]. Sólo pasaron unos años hasta que en 1933, Alexander Jablonski planteó el proceso de relajación desde el estado metaestable a través de un mecanismo no radiativo, y a través de esta transición, una segunda emisión a longitudes de onda mayores es entonces posible como también una débil absorción, proceso conocido como fosforescencia. [Jablonski A. 1935, *Z. Physik* 94, 38-46].

[20] a) N. J. Turro, M. H. Kleinman, E. Karatekin, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2000, 39, 4437. b) I. B. Berlman, *Handbook of Fluorescence Spectra of Aromatic Molecules*, Academic Pr., 2nd ed, 1971. c) D. C. Neckers, *Mechanistic Organic Photochemistry*, Reinhold Pub. Corp., 1967.

[21] a) W. H. Mulder, *J. Photochem. Photobiol. A*, 2003, 161, 21. b) M. K. Babu, K. Rajasekaran, N. Kannan, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 1986, 1721.

[22] a) C. Parkanyi, D. Bouin, D. C. Shieh, S. Tunbrant, J. J. Aaron, A. Tine, *J. Chim. Phys.*, 1984, 81, 21. d) A. Weller, *Z. Elektrochem.*, 1952, 56, 662. b) E. L. Wehry, L. B. Rogers, *Spectrochim. Acta*, 1965, 21, 1976. c) H. R. Park, B. Mayer, P. Wolschann, G. Köhler, *J. Phys. Chem.*, 1994, 98, 6158.

[23] a) A. A. Lamola, N. J. Turro, *Energy Transfer and Organic Photochemistry (Technique of Organic Chemistry)*, John Wiley & Sons Inc., 1969. b) V. Ramamurthy, K. S. Schanze, *Semiconductor Photochemistry and Photophysics*, CRC Press, 2003. c) N. J. Turro, M. H. Kleinman, E. Karatekin, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2000, 39, 4437.

[24] P. Arranz, M. T. Albelda, E. García-España, J. C. Lima, C. Lodeiro, J. S. de Melo, A. J. Parola, F. Pina, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 2002, 3024.

[25] a) T. W. Bell, N. M. Hext, *Chem. Soc. Rev.*, 2004, 33, 589. b) L. Fabbrizzi, A. Poggi, *Chem. Soc. Rev.*, 1995, 24, 197.

[26] R. A. Bissell, A. P. de Silva, H. Q. N. Gunaratne, P. L. M. Lynch, G. E. M. Maguire, K. R. A. S. Sandanayake, *Chem. Soc. Rev.*, 1992, 21, 187.

[27] B. Valeur, I. Leray, *Coord. Chem. Rev.*, 2000, 205, 3.

[28] J. Biwersi, B. Tulk, A. S. Verkman, *Anal. Biochem.*, 1994, 219, 139.

[29] A. Corma, M. S. Galletero, H. García, E. Palomares, F. Rey, *Chem Commun.*, 2002, 1100.

[30] A. P. De Silva, H. Q. N. Gunaratne, T. Gunnlaugsson, A. J. M. Huxley, C. P. Mc. Coy, J. P. Rademacher, T. E. Rice, *Chem. Rev.*, 1997, 97, 1515.

[31] F. Goppelsröder, *J. Prakt. Chem.*, 1867, 101, 408.

[32] E. Destandau, V. Alain, E. Bardez, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2004, 378, 402.

[33] R. Kato, S. Nishizawa, T. Hayashita, N. Teramae, *Tetrahedron Lett.*, 2001, 42, 5053.

[34] a) J. Y. Lee, S. H. Kim, J. H. Jung, J. S. Kim, *J Org. Chem.*, 2005, 70, 1463. b) M. E. Huston, C. Engleman, A. W. Czarnik, *J Am. Chem. Soc.*, 1990, 112, 7054. c) A. W. Czarnik, *Fluorescent chemosensors for ion and molecule recognition*, vol. 538. American Chemical Society, Washington DC, 1993.

[35] En la figura 1.21 se mostraba un ejemplo en el que la unión entre el receptor y el sustrato provocaba un cambio negativo (disminución en la emisión de fluorescencia) respecto al receptor libre. Hay que tener en cuenta que el proceso de reconocimiento no implica siempre una disminución de la respuesta fluorescente, sino que puede darse el proceso opuesto en el que el receptor no es fluorescente y el reconocimiento del sustrato induce una aparición de la emisión de fluorescencia.

[36] A. P. de Silva, S. A. de Silva, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1986, 1709.

[37] a) S. L. Wiskur, H. Ait-Haddou, J. J. Lavigne, E. V. Anslyn, *Acc. Chem. Res.*, 2001, 34, 963. b) L. Fabbrizzi, M. Licchelli, A. Taglietti, *Dalton Trans.*, 2003, 39, 3471. c) A. Buryak, K. Severin, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2004, 43, 4771.

[38] L. A. Joyce, S. H. Shabbir, E. V. Anslyn, *Chem. Soc. Rev.*, 2010, 39, 3621.

[39] B. T. Nguyen, E. V. Anslyn, *Coord. Chem. Rev.*, 2006, 250, 3118.

[40] S. L. Wiskur, H. Ait-Haddou, J. J. Lavigne, E. V. Anslyn, *Acc. Chem. Res.*, 2001, 34, 963.

[41] R. Grosschedl, K. Giese, J. Pagel, *Trends Genet.*, 1994, 10, 94.

[42] S. H. Shabbir, C. J. Regan, E. V. Anslyn, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2009, 106, 10487.

[43] V. Dujols, F. Ford, A. W. Czarnik, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, 119, 7386.

[44] M.-Y. Chae, A. W. Czarnik, *J. Am. Chem. Soc.* 1992, 114, 9704.

[45] C. A. Roeschlaub, N. L. Maidwell, R. Rezai, P. G. Sammes, *Chem. Commun.* 1999, 1637.

[46] D. Jiménez, R. Martínez-Mañez, F. Sancenón, J. V. Ros-Lis, A. Benito, J. Soto, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, 125, 9000.

[47] A. P. de Silva, H. Q. N. Gunaratne, T. Gunnlaugsson, A. J. M. Huxley, C. P. McCoy, J. T. Rademacher, T. E. Rice, *Chem. Rev.*, 1997, 97, 1515.

[48] Se ha decidido indicar las siglas en inglés.

[49] S. Alves, F. Pina, M. T. Albelda, E. García-España, C. Soriano, S. V. Luis, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2001, 405.

[50] W. Rettig, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1986, 25, 971.

[51] G. A. Smith, T. R. Hesketh, J. C. Metcalfe, *J. Biochem.*, 1988, 250, 227.

[52] a) J. Bourson, M.-N. Borrel, B. Valeur, *Anal. Chim. Acta*, 1992, 257, 189. b) J. Bourson, J. Pouget, B. Valeur, *J. Phys. Chem.*, 1993, 97, 4552. c) J. Bourson, F. Badaoui, B. Valeur, *J. Fluoresc.*, 1994, 4, 275. d) J.-L. Habib Jiwan, C. Branger, J.-Ph. Soumillion, B. Valeur, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, 1998, 116, 127.

[53] a) J. S. de Melo, J. Pina, F. Pina, C. Lodeiro, A. J. Parola, J. C. Lima, M. T. Albelda, M. P. Clares, E. Garcia-España, C. Soriano, *J. Phys. Chem. A*, 2003, 107,

11307. b) F. M. Winnik, *Chem. Rev.*, 1993, 93, 587.

[54] M. T. Albelda, E. García-España, L. Gil, J. C. Lima, C. Lodeiro, J. S. de Melo, M. J. Melo, A. J. Parola, F. Pina, C. Soriano. *J. Phys. Chem. B*, 2003, 107, 6573.

[55] L. Rodríguez, E. Delgado-Pinar, A. Sornosa-Ten, J. Alarcón, E. García-España, M. Cano, J. C. Lima, F. Pina, *J. Phys. Chem. B.*, 2009, 113, 15455.

[56] K. Kubo, N. Nato, T. Sakurai, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1997, 70, 341.

[57] a) S. M. Borisov, I. Klimant, *Analyst*, 2008, 133, 1302. b) F. Mancini, P. Scrimin, P. Tecilla, U. Tonellato, *Coord. Chem. Rev.*, 2009, 253, 2150.

c) T. Doussineau, A. Schulz, A. Lapresta-Fernandez, A. Moro, S. Korsten, S. Trupp, G. J. Mohr, *Chem. Eur. J.*, 2010, 16, 10290.

[58] W. Zhong, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2009, 394, 47.

[59] a) A. Burns, H. Ow, U. Wiesner, *Chem. Soc. Rev.*, 2006, 35, 1028. b) S. Bamrungsap, Z. Zhao, T. Chen, L. Wang, C. Li, T. Fu, W. Tan, *Nanomedicine*, 2012, 7 (8), 1253.

[60] a) B. Y. S. Kim, J. T. Rutka, W. C. W. Chan, *New Engl. J. Med.*, 2010, 363, 2434. b) J. B. Delehanty, K. Boeneman, C. E. Bradburne, K. Robertson, I. L. Medintz, *Exp. Opin. Drug Delivery*, 2009, 6, 1091. c) H. S. Choi, J. V. Frangioni, *Mol. Imaging*, 2010, 9, 291. d) M. Baker, *Nat. Methods*, 2010, 7, 957.

[61] P. Teolato, E. Rampazzo, M. Arduini, F. Mancin, P. Tecilla, U. Tonellato, *Chem. Eur. J.*, 2007, 13, 2238.

[62] a) X. Michalet, F. F. Pinaud, L. A. Bentolila, J. M. Tsay, S. Doose, J. J. Li, G. Sundaresan, A. M. Wu, S. S. Gambhir, S. Weiss, *Science*, 2005, 307, 538. b) R. Gill, M. Zayats, I. Willner, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2008, 47, 7602.

[63] a) S. M. Borisov, I. Klimant, *Analyst*, 2008, 133, 1302. b) F. Mancin, P. Scrimin, P. Tecilla, U. Tonellato, *Coord. Chem. Rev.*, 2009, 253, 2150. c) T. Doussineau, A. Schulz, A. Lapresta-Fernández, A. Moro, S. Körsten, S. Trupp, G. J. Mohr, *Chem. Eur. J.*, 2010, 16, 10290. d) H. Goesmann, C. Feldmann, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2010, 49, 1362.

[64] K. E. Sapsford, W. R. Algar, L. Berti, K. B. Gemmill, B. J. Casey, E. Oh, M. H. Stewart, I. L. Medintz, *Chem. Rev.*, 2013, 113, 1904.

[65] M. Ferrari, *Nat Rev Cancer*, 2005, 5, 161.

[66] S. Bonacchi, D. Genovese, R. Juris, M. Montalti, L. Prodi, E. Rampazzo, M. Sgarzi, N. Zaccheroni, *Top. Curr. Chem.*, 2011, 300, 93.

[67] G. D. Scholes, G. Rumbles, *Nat. Mater.*, 2006, 5, 683.

[68] Y. Chen, Z. Rosenzweig, *Anal. Chem.*, 2002, 74, 5132.

[69] a) I. L. Medintz, A. R. Clapp, H. Mattoussi, E. R. Goldman, B. Fisher, J. M. Mauro, *Nat. Mater.*, 2003, 2, 630. b) P. Sharma, S. Brown, G. Walter, S. Santra, B. Moudgil, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 2006, 123, 471.

[70] S.T. Selvan, T. T. Tan, J. Y. Ying, *Adv. Mater.*, 2005, 17, 1620.

[71] C. Kirchner, T. Liedl, S. Kudera, T. Pellegrino, A. M. Javier, H. E. Gaud, S. Stolzle, N. Fertig, W. J. Parak, *Nano Lett.*, 2005, 5, 331.

[72] a) S-W. Kim, J. P. Zimmer, S. Ohnishi, J. B. Tracy, J. V. Frangioni, M. G. Bawendi, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, 127, 10526. b) R. Xie, K. Chen, X. Chen, X. Peng, *Nano Res.*, 2008,1, 457. c) S. Kim, Y. T. Lim, E. G. Soltesz, A. M. De Grand, J. Lee, A. Nakayama, J. A. Parker, T. Mihaljevic, R. G. Laurence, D. M. Dor, L. H. Cohn, M. G. Bawendi, J. V. Frangioni, *Nat. Biotechnol.*, 2004, 22, 93. d) A. Aharoni, T. Mokari, I. Popov, U. Banin, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, 128, 257.

[73] I. L. Medintz, H. Mattoussi, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2009, 11, 17.

[74] J. S. Bradley, G. Schmid, *Clusters and colloids: from theory to applications*, Chap. 6, VCH, Weinheim, 1994.

[75] M. Brust, M. Walker, D. Bethell, D. J. Schiffrin, R. Whyman, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1994, 801.

[76] G. Mie, *Annal. Phys.* 1908, 25, 377.

[77] a) M. C. Daniel, D. Astruc, *Chem. Rev.*, 104, 2004, 293. b) P. V. Kamat, *J. Phys. Chem. B*, 2002,106, 7729. c) K. G. Thomas, P. V. Kamat, *Acc. Chem. Res.*, 2003, 36, 888.

[78] a) S. Lai, N. K. Grady, J. Kundu, C. S. Levin, J. B. Lassiter, N. J. Halas, *Chem. Soc. Rev.*, 2008, 37, 898. b) S. Watanabe, M. Sonobe, M. Arai, Y. Tazume, T. Matsuo, T. Nakamura, K. Yoshida, *Chem. Commun.*, 2002, 2866.

[79] a) S. Y. Lin, C. H. Chen, M. C. Lin, H. F. Hsu, *Anal. Chem.*, 2005, 77, 4821. b) S-Y. Lin, S-W. Liu, C-M. Lin, C-H. Chen, *Anal. Chem.*, 2002, 74, 330.

- [80] a) G. Battistino, P. G. Cozzi, J-P. Jalkanen, M. Montalti, L. Prodi, N. Zaccheroni, F. Zerbetto, *ACS Nano*, 2008, 2, 77. b) E. Dulkeith, M. Ringle, T. A. Klar, J. Feldmann, *Nano Lett.*, 2005, 5, 585.
- [81] T. Gu, J. K. Whitesell, M. A. Fox, *Chem. Mater.*, 2003, 15, 1358.
- [82] M. Montalti, N. Zaccheroni, L. Prodi, N. O'Reilly, S. L. James, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, 129, 2418. b) T. Huang, R. W. Murray, *J. Phys. Chem. B*, 2001, 105, 12498.
- [83] S. Iijima, *Nature*, 1991, 354, 56.
- [84] M. Crego-Calama, D. N. Reinhoudt, *Adv. Mater.*, 2001, 13, 1171.
- [85] L. Basabe-Desmonts, J. Beld, R. S. Zimmerman, J. Hernando, P. Mela, M. F. García-Parajó, N. F. van Hulst, A. van den Berg, D. N. Reinhoudt, M. Crego-Calama, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, 126, 7293.
- [86] a) A. Burns, P. Sengupta, T. Zedayko, B. Baird, U. Wiesner, *Small*, 2006, 2, 723. b) G. Farruggia, S. Iotti, L. Prodi, M. Montalti, N. Zaccheroni, P. B. Savage, V. Trapani, P. Sale, F. I. Wolf, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, 128, 344. c) Q. A. Pankhurst, J. Connolly, S. K. Jones, J. Dobson, *J. Phys. D Appl. Phys.*, 2003, 36, R167.
- [87] M. Tan, G. Wang, X. Hai, J. Yuan, *J. Mater. Chem.*, 2004, 14, 2896.
- [88] R. Grifantini, E. Bartolini, A. Muzzi, M. Draghi, E. Frigimelica, J. Berger, G. Ratti, R. Petracca, G. Galli, M. Agnisdei, M. M. Giuliani, L. Santini, B. Brunelli, R. Rappuoli, F. Randazzo, G. Grandi, *Nat. Biotechnol.*, 2002, 20, 914.
- [89] a) C. Barbé, J. Bartlett, L. Kong, K. Finnie, H. Q. Lin, M. Larkin, S. Calleja, A. Bush, G. Calleja, *Adv. Mater.*, 2004, 16, 1959. b) M. Arruebo, R. Fernández-Pacheco, M. R. Ibarra, J. Santamaría, *Nano Today*, 2007, 2, 22.
- [90] J. Dobson, *Gene Ther.*, 2006, 13, 283.
- [91] P. Teolato, E. Rampazzo, M. Arduini, F. Mancin, P. Tecilla, U. Tonellato, *Chem. Eur. J.*, 2007, 13, 2238.

[92] E. Rampazzo, E. Brasola, S. Marcuz, F. Mancin, P. Tecilla, U. Tonellato, *J. Mater. Chem.*, 2005, 15, 2687.

[93] M. Montalti, L. Prodi, N. Zaccheroni, G. Battistini, S. Marcuz, F. Mancin, E. Rampazzo, U. Tonellato, *Langmuir*, 2006, 22, 5877.

[94] a) M. Montalti, L. Prodi, N. Zaccheroni, *J. Mater. Chem.*, 2005, 15, 2810. b) M. Montalti, L. Prodi, N. Zaccheroni, G. Falini, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, 124, 13540. c) E. Brasola, F. Mancin, E. Rampazzo, P. Tecilla, U. Tonellato, *Chem. Commun.*, 2003, 3026. d) I. A. Levitsky, S. G. Krivoslykov, J. Grate, *J. Phys. Chem. B*, 2001, 105, 8468.

[95] S. Bonacchi, E. Rampazzo, M. Montalti, L. Prodi, N. Zaccheroni, F. Mancin, P. Teolato, *Langmuir*, 2008, 24, 8387.

[96] a) J.L. Lee, D.R. Bae, W.S. Han, S.S. Lee, J.H. Jung, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2008, 118. b) S. Seo, H.Y. Lee, M. Park, J.M. Lim, D. Kang, J. Yoon, J.H. Jung, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2010, 843. c) J. Zheng, C. Xiao, Q. Fei, M. Li, B. Wang, G. Feng, H. Yu, Y. Huan, Z. Song, *Nanotechnology*, 2010, 21, 045501. d) L. Mu, W. Shi, J. C. Chang, S. T. Lee, *Nano Lett.*, 2008, 8, 104. e) D. Gao, Z. Wang, B. Liu, L. Ni, M. Wu, Z. Zhang, *Anal. Chem.*, 2008, 80, 8545.

[97] a) P. Grandini, F. Mancin, P. Tecilla, P. Scrimin, U. Tonellato, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1999, 38, 3061. b) M. Berton, F. Mancin, G. Stocchero, P. Tecilla, U. Tonellato, *Langmuir*, 2001, 17, 7521.

[98] Y. Zheng, J. Orbulescu, X. Ji, F. M. Andreopoulos, S. M. Pham, R. M. Leblanc, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, 125, 2680.

[99] M. Crego-Calama, D. N. Reinhoudt, *Adv. Mater.*, 2001, 13, 1171.

[100] E. Rampazzo, E. Brasola, S. Marcuz, F. Mancin, P. Tecilla, U. Tonellato, *J. Mater. Chem.*, 15, 2005, 2687.

[101] a) R. Shenhar, V. M. Rotello, *Acc. Chem. Res.*, 2003, 36, 549. b) C. M. Niemeyer, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2001, 40, 4128. c) P. Buhlmann, E. Pretsch, E. Bakker, *Chem. Rev.*, 1998, 98, 1593. d) S. Peper, I. Tsagkatakis, E. Bakker, *Anal. Chim. Acta*, 2001, 442, 25.

[102] K. Ai, B. Zhang, L. Lu, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2009, 48, 304.

[103] J. Peng, X. He, K. Wang, W. Tan, Y. Wang, Y. Liu, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2007, 388, 645.

[104] A. Henglein, *Chem. Rev.*, 1989, 89, 1861.

[105] C. F. Hoener, K. A. Allan, A. J. Bard, A. Campion, M. A. Fox, T. E. Malluok, S. E. Webber, J. M. White, *J. Phys. Chem.*, 1992, 96, 3812.

[106] a) W. Schaertl, *Nanoscale*, 2010, 2, 829. b) X. Zhao, R. Tapecc-Dytioco, K. Wang, W. Tan, *Anal. Chem.*, 2003, 75, 13476.

2.

**Características estructurales y
microestructurales
de la bohemita.**



2.1. Introducción.

Los óxidos metálicos juegan un papel muy importante en muchas áreas de la química, la física y la ciencia de los materiales.¹ Se pueden comportar como sólidos metálicos, semiconductores o aislantes,² lo que ha permitido un gran número de aplicaciones en materiales avanzados, tales como circuitos microelectrónicos, sensores, catalizadores, etc.³

Los óxidos metálicos de tamaño nanométrico han sido ampliamente estudiados debido a su elevada área superficial, su porosidad y su empleo en el área de la catálisis.⁴ Las propiedades de estos materiales se pueden controlar a través de la estructura cristalina, forma, tamaño y características superficiales, que pueden ser moduladas mediante la utilización de reactivos y procedimientos sintéticos adecuados.

2.2. Síntesis de materiales oxídicos.

La química en disolución es un método fácil y versátil para formar partículas oxídicas de tamaño nanométrico. El control del tamaño y/o la morfología de las nanopartículas es de gran importancia ya que muchas de las propiedades finales de estos materiales dependen en gran medida de la relación superficie-volumen y de la forma de las mismas. Por ejemplo, la actividad catalítica de estos sistemas está estrechamente relacionada con el tamaño y la forma de las caras cristalinas expuestas.⁵ Las propiedades ópticas de un material dependen en gran medida del tamaño de partícula, ya que las variaciones en el tamaño gobiernan la energía electrónica interbanda o el confinamiento del fonón.⁶ Otro ejemplo en el que el tamaño, la forma y los efectos de superficie condicionan el uso de las nanopartículas en una aplicación específica es el caso de materiales con

propiedades magnéticas, ya que estos parámetros influyen tanto en la relajación superparamagnética como en la coercitividad.⁷ Y por último, el comportamiento de cristales líquidos formados a partir de dispersiones acuosas de partículas oxídicas, donde la morfología ha resultado ser fundamental, ya que el tamaño gobierna tanto la dispersión de las partículas como las interacciones entre ellas. Por lo tanto, para controlar muchas de las características de las nanopartículas oxídicas, en particular la estructura cristalina de compuestos polimórficos, o el tamaño y la forma de compuestos como el óxido de aluminio, de hierro o de titanio es muy útil recurrir a la química acuosa de metales catiónicos.^{8,9}

Los parámetros principales que controlan la síntesis de estos sistemas son la acidez de la disolución,¹⁰ la presencia de aniones específicos y la temperatura.¹¹ La acidez y la temperatura controlan la hidrólisis de los complejos metálicos hacia la formación de los sólidos,⁹ sin embargo, la presencia de determinados contraiones juegan un papel muy importante en la forma y el tamaño final de los óxidos.^{12, 13}

Una vez que las nanopartículas se han formado y se encuentran en suspensión, pueden sufrir cambios espontáneos en su estructura, morfología, y pueden aumentar de tamaño con el tiempo según el principio de maduración de Ostwald (figura 2.1). Esto se debe a que las partículas se forman en un primer momento bajo control cinético: nucleación y crecimiento (mayor cantidad de partículas pequeñas),¹⁴ mientras que con el paso del tiempo y para alcanzar un estado termodinámicamente más estable, se produce una disolución-cristalización (las partículas más pequeñas se redisuelven mientras que el resto aumentan de tamaño). Esto permite una disminución de la entalpía libre del sistema a través de una reducción del área superficial de las partículas finales.

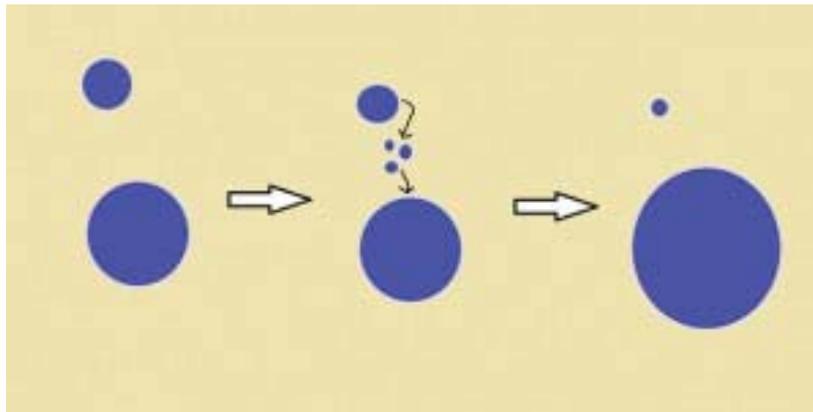


Figura 2.1. Crecimiento de partículas según el principio de Ostwald.

Para impedir este proceso y contar con una relación superficie específica-volumen elevada (que para muchas aplicaciones es un requisito indispensable), es necesario llevar a cabo la precipitación del sólido a un pH lejano al del PZC y en condiciones de fuerza iónica elevada (donde la carga electrostática en la superficie es lo suficientemente elevada). Con ello, se impide la maduración de las partículas y el tamaño se controla con el pH del medio. La estrecha correlación entre el tamaño de partícula y la densidad de carga electrostática superficial lleva a un control termodinámico antes que cinético, como en las microemulsiones¹⁵ y que se ha asociado con la disminución de la tensión interfacial óxido-disolución. Todo el proceso de obtención de nanopartículas queda esquematizado en la figura 2.2.

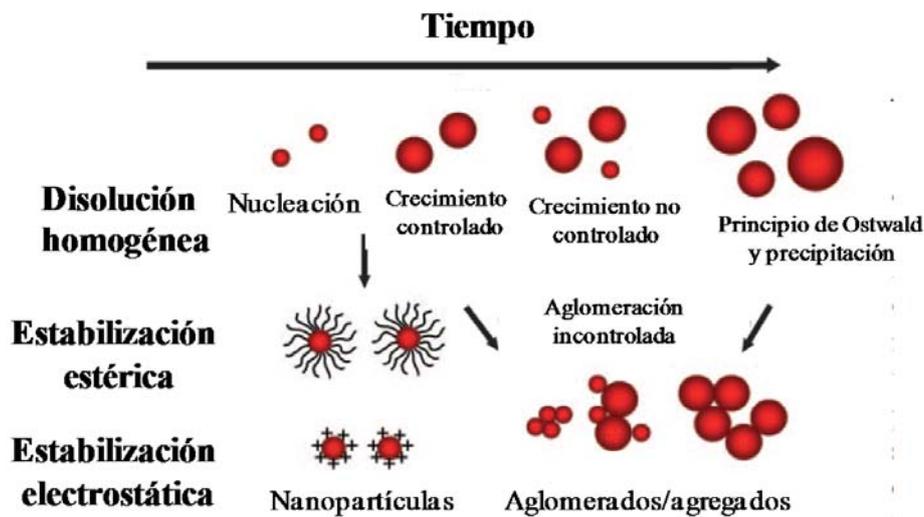


Figura 2.2. Evolución del crecimiento y estabilización de nanopartículas.

2.3. Bohemita.

La bohemita es un oxohidróxido de aluminio cuya estructura puede estar compuesta por diferentes cantidades de agua o tamaños de cristalito¹⁶. En muchos casos la bohemita o γ -AlO(OH) es el material de partida en la síntesis de diferentes fases de alúmina (Al_2O_3) (figura 2.3), material de bajo coste que se emplea en diferentes campos como la catálisis, cerámica, electrónica, biomedicina, etc. Sin embargo, por sí misma, la bohemita es usada en una gran variedad de aplicaciones, desde absorbente¹⁷, en recubrimientos¹⁸, como refuerzo en materiales cerámicos¹⁹, en rellenos de columnas²⁰ hasta en el tratamiento de aguas²¹.

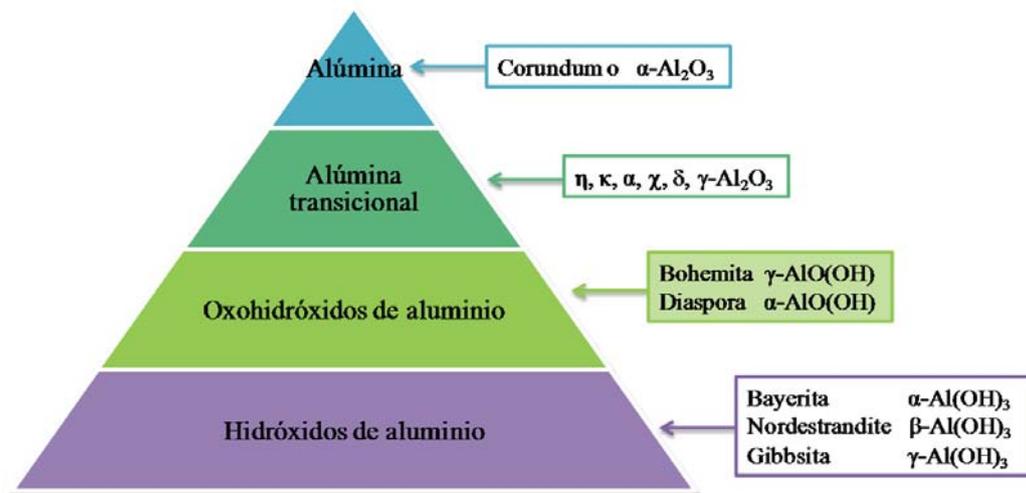


Figura 2.3. Posición de la bohemita dentro de la ruta sintética de la alúmina.

En un principio se pensaba que la bohemita existía bajo dos formas diferentes, la forma puramente cristalina llamada bohemita y la llamada pseudoboemita (o también conocida como bohemita gelatinosa)²² con una morfología, porosidad y área superficial diferente a la primera. Sin embargo, estudios cristalográficos²³ han demostrado claramente que la pseudoboemita es simplemente una bohemita micro- o nanocristalina, con diferencias en cuanto al tamaño de los cristalitos.

Como se ha comentado anteriormente, la bohemita nanocristalina despierta un gran interés debido a su importancia técnica en la preparación de catalizadores con porosidad controlada y con propiedades mecánicas mejoradas^{5a, 24}. La bohemita se obtiene mayoritariamente por hidrólisis de alcóxidos de aluminio o por precipitación de sales de aluminio. Matijevic *et al.*²⁵ y Panias *et al.*²⁶ han descrito diferentes propiedades de la bohemita como el tamaño de partícula, la morfología y la estructura, en función tanto de la naturaleza de los precursores de aluminio como de las condiciones de síntesis utilizadas. En base a sus trabajos se conoce que en un primer

momento se obtiene las “pre-partículas” de bohemita (partículas primarias), que consisten en aglomeraciones de cristalitos agregados. Cabe diferenciar en este momento que la agregación se considera un fenómeno irreversible resultado de una unión o un enlace entre los cristalitos, mientras que por el contrario, la aglomeración es un fenómeno reversible que implica enlaces débiles como fuerzas electrostáticas atractivas o enlaces de Van der Waals^{24d}. En este sentido es muy importante evitar la agregación de las partículas y reducir al máximo la aglomeración con el fin de obtener suspensiones homogéneas estables. Para conseguir reducir la aglomeración de los cristalitos a un tamaño lo suficientemente pequeño para que permanezcan en suspensión, se realiza el proceso conocido como peptización como último paso de la ruta sintética de las partículas.²⁷ Este paso consiste en la adsorción de protones o iones hidroxilo en la superficie de las partículas lo que causa una repulsión electrostática. Se han realizado gran cantidad de estudios basados en el cambio de las propiedades estructurales de la bohemita según el tipo de ácido o, la relación molar OH/H-Al empleada en la peptización para obtener soluciones metaestables o pastas homogéneas.^{24c, 28} Dentro de los estudios realizados, es interesante destacar el llevado a cabo por Yoldas²⁹ en el que muestra cómo el área superficial específica se ve afectada por la cantidad de ácido usado en la etapa de peptización. En este sentido, Yoldas propone que hay una cantidad de ácido máxima para peptizar los grupos hidroxilo y obtener una disolución coloidal transparente, por encima de la cual se aumentan de manera considerable las fuerzas de repulsión entre las partículas coloidales, aumentando el volumen del gel, lo que tiene una influencia negativa en varias propiedades finales del material que se obtiene de este gel.

2.3.1. Estructura cristalina.

La estructura cristalina de la bohemita se ha refinado con una celda unidad ortorómbica con el grupo espacial de simetría $Cmcm$. La unidad estructural de los cristales de bohemita consiste en cadenas dobles de AlO_6 octaédricas, dando como resultado una unidad dimérica. En la figura 2.4 se puede ver de manera clara la estructura de la unidad octaédrica formada por octaedros de oxígenos con los átomos de aluminio cerca del centro y átomos de oxígeno en sus vértices; 2 de los átomos de oxígeno pertenecen a los iones hidroxilo.

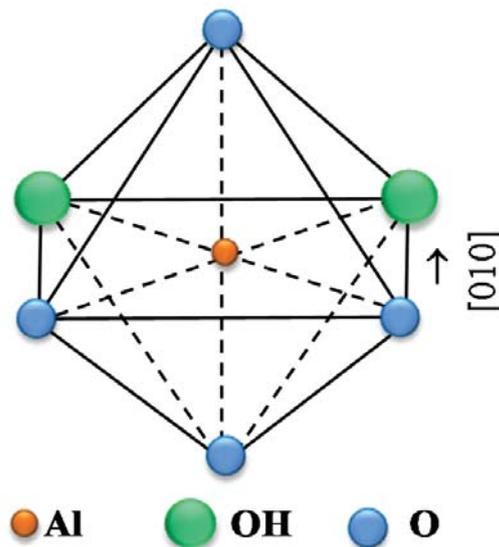


Figura 2.4. Octaedro representando la estructura cristalina de la bohemita.^{23d}

Los octaedros forman capas dobles perpendiculares al eje b que interaccionan entre ellos a través de enlaces de hidrógeno $OH \cdots O$. Este tipo de enlace tiene energías típicas de 20 kJ/mol^{30} que se destruyen a temperaturas entre 300 y 500°C cuando la bohemita se transforma en $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$, que es la primera de las denominadas aluminas transicionales. Información más detallada (longitudes de enlace covalente O-H y electrostático O-H...O) sobre este enlace se puede encontrar en artículos

en los que se llevan a cabo experimentos de difracción de neutrones,³¹ técnica que también ha sido empleada para caracterizar otras fases isomorfas como la lepidocrocita o la fase gamma del FeO(OH).³²

Se ha comentado anteriormente que las capas dobles de octaedros de bohemita están orientadas paralelas a los ejes de la celda unidad. A lo largo del eje *c*, los octaedros se encuentran compartiendo vértices (figura 2.5), mientras que a lo largo del eje *a* se encuentran compartiendo aristas (figura 2.6).

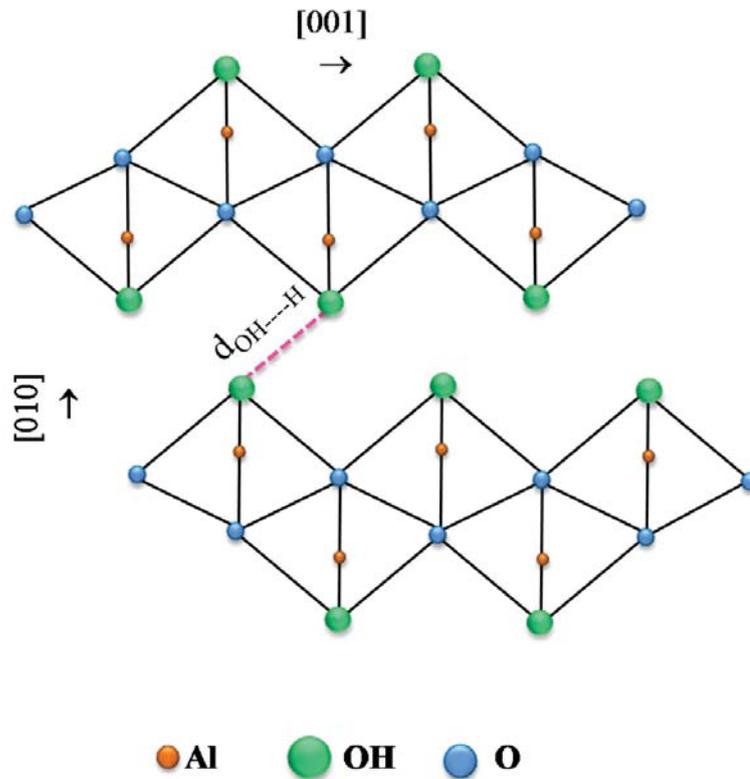


Figura 2.5. Proyección de la estructura cristalina de la bohemita perpendicular al eje *a*. En línea discontinua se muestra el enlace de hidrógeno entre las capas dobles.^{23d}

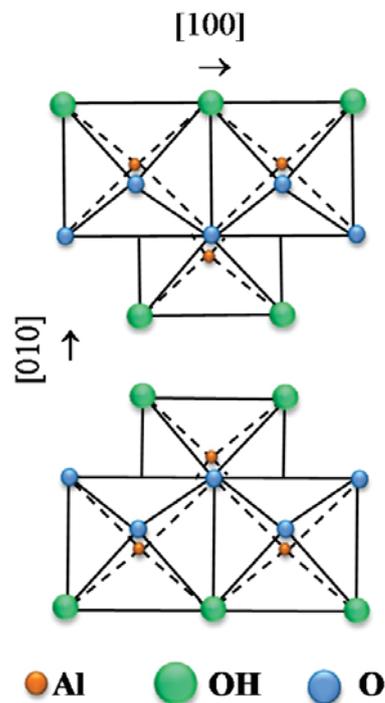


Figura 2.6. Proyección de la estructura cristalina de la a lo largo de la dirección [001].^{23d}

Cada átomo de oxígeno (no perteneciente a los grupos hidroxilo) se encuentra compartido por cuatro octaedros. Por el contrario, el átomo de oxígeno del grupo hidroxilo sólo se encuentra compartido por dos octaedros. Esta distribución revela que las interacciones a lo largo del plano *a-c*, debidas a la interacción entre átomos de oxígeno compartidos por 4 octaedros y los átomos de aluminio, son más fuertes que la interacción entre dos octaedros de la doble capa, lo que finalmente favorece que el crecimiento del cristal se produzca a lo largo de los planos y no perpendiculares a ellos.³³ Debido a esto, la superficie del cristal se encuentra totalmente cubierta de grupos hidroxilo unidos a átomos de aluminio. Los átomos de oxígeno pertenecientes a los grupos hidroxilo tienen un orbital libre responsable de los enlaces de hidrógeno que mantienen unidas las dobles capas de octaedros cuando el cristal crece. Si

el cristal no continúa creciendo, los grupos hidroxilo se quedan en la superficie de manera que podrían ser empleados para modificar la superficie de la bohemita con moléculas orgánicas (figura 2.7), siendo éste uno de los objetivos principales de estudio de la presente tesis doctoral.

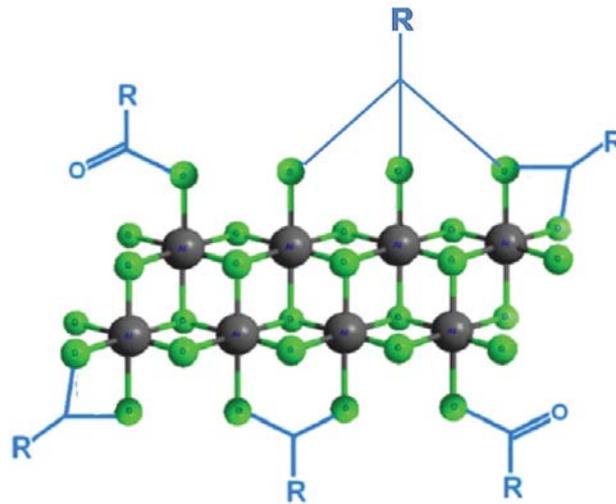


Figura 2.7. Diferentes modos de coordinación a la superficie de bohemita.

En la figura 2.8 se muestra un patrón de difracción de rayos X experimental obtenido para una de las muestras sintetizadas de bohemita con valores de $2\theta^\circ$ de 13.71, 28.31, 38.41, 49.21 y 64.81. Los picos de difracción son anchos en comparación con otros patrones de difracción, lo que refuerza la idea de que el tamaño de los cristalitas es pequeño. Es más, como puede verse en la figura, la anchura de las bandas es diferente siendo la primera reflexión (correspondiente a la 020) más ancha que el resto.

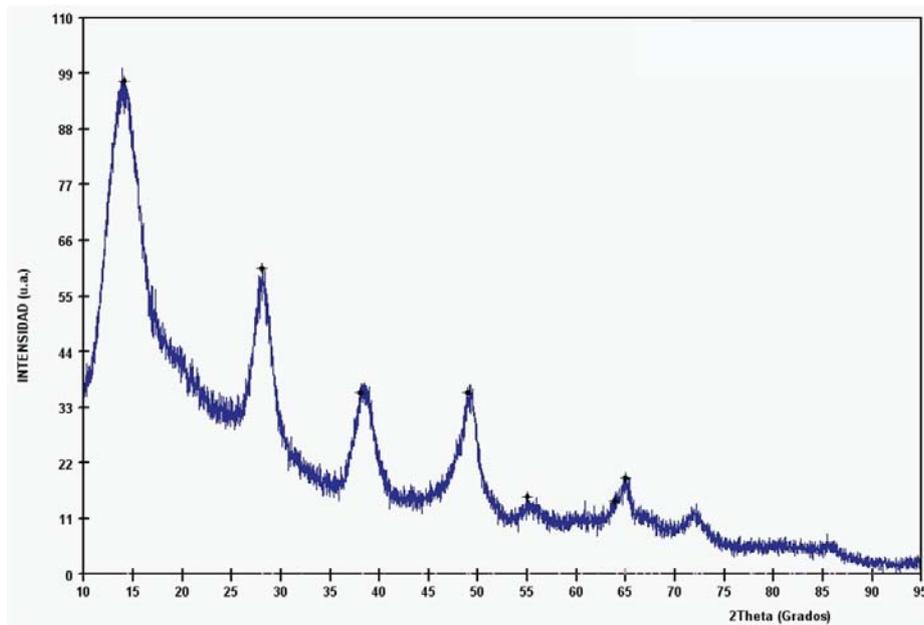


Figura 2.8. Difractograma experimental de una muestra de nanopartículas de bohemita.

2.3.2. Síntesis.

Las diferentes rutas de síntesis de bohemita cristalina se pueden agrupar en tres grandes bloques:

*.- Descomposición de la gibsita (o hidrargilita) $\text{Al}(\text{OH})_3$, controlando tanto la temperatura como la velocidad de calentamiento, así como la presión del vapor.^{34,35}

*.- Precipitación en disolución acuosa a partir de disoluciones ácidas o básicas de aluminio, controlando el proceso por medio de reactivos básicos^{36,37} (NaOH , NH_3 , Na_2CO_3) o ácidos³⁸ (CO_2 , HCl , HNO_3), la velocidad de adición, la temperatura, el pH final y el tiempo de reacción.^{39,40}

*.- Procedimiento sol-gel, generalmente a partir de alcoholatos de aluminio, con la posibilidad de obtener tanto xerogeles^{41,42,43,44} como aerogeles.^{45,46,47}

Dado que las dos últimas vías son las más usuales en el campo de la investigación, se va a proceder a profundizar un poco más en ellas.

Las disoluciones de bohemita pueden prepararse como se ha comentado anteriormente, a través de la hidrólisis de alcóxidos de aluminio, de la hidrólisis forzada de varias sales de aluminio o mediante la peptización de hidróxidos de aluminio. Se ha comprobado que algunas propiedades de las partículas de bohemita como el tamaño, la morfología y la microestructura dependen en gran medida de los reactivos empleados en su síntesis y las condiciones experimentales utilizadas. Por ejemplo, si la disolución de la sal de aluminio^{25a} o el alcóxido de aluminio⁴⁸ inicial contiene ciertos aniones (iones sulfato) y se mantiene a altas temperaturas, se obtiene una disolución acuosa formada por partículas esféricas con un alto grado de homogeneidad. Controlando la concentración inicial de la sal de aluminio y de sulfato, el pH inicial y la temperatura es también posible la obtención de un óxido de aluminio amorfo que evoluciona hacia la cristalización de bohemita.

También se ha estudiado la preparación de una dispersión de bohemita coloidal a partir de disoluciones de cloruro o perclorato de aluminio. A una concentración dada de sal, la velocidad de crecimiento de las partículas se ve influenciada por la temperatura final de reacción.^{25c}

Por otra parte, se ha descubierto la importancia tanto del tipo como de la concentración del ácido y de la temperatura de reacción en la formación de la disolución coloidal. Los primeros trabajos desarrollados

sobre este punto fueron publicados por Yoldas et al. en 1975.²⁹ Entre los parámetros a tener en cuenta en la síntesis de la bohemita, se vio que el tipo de ácido juega un papel crucial mucho más importante que el pH del sistema. El proceso de peptización se completa cuando la concentración de HCl, HNO₃ o HClO₄ varía entre 0.03 y 0.1 moles de ácido por mol de hidróxido. Parece ser que hay dos requisitos principales que debe cumplir el ácido utilizado en la peptización. Por una parte el anión del ácido (la base conjugada del ácido) no debe complejarse con los iones aluminio presentes en la disolución, y por otra parte el ácido debe ser lo suficientemente fuerte para producir el efecto de carga en la superficie de las nanopartículas anteriormente mencionado. La velocidad de peptización depende también en gran medida del tratamiento térmico: temperaturas y presiones altas la favorecen, mientras que en los casos en los que se ha utilizado temperaturas de reacción por debajo de los 80 °C la velocidad de peptización disminuye de manera drástica.

Milonjic *et al.* han descrito la preparación de disoluciones de bohemita de diferentes formas y tamaños de partícula mediante la peptización hidrotermal de precipitados de hidróxido de aluminio.⁴⁹ Estos autores obtuvieron partículas esféricas de bohemita al peptizar Al(OH)₃ con HNO₃ a 152 °C, mientras que al variar la temperatura de reacción a 182 o 100 °C obtuvieron partículas hexagonales o fibrilares respectivamente. Por otra parte, los mismos autores estudiaron el efecto que tenía la presencia de diferentes aniones en la disolución, en la forma y el tamaño final de las partículas de bohemita.⁵⁰ Observaron el diferente grado de estabilidad de las disoluciones coloidales en presencia de diferentes aniones: NO₃⁻, Cl⁻, I⁻, SO₄²⁻ y [Fe(CN)₆]³⁻ y cómo la concentración crítica de anión, a la cual se produce la coagulación de las partículas, disminuye al aumentar el pH de la disolución.

Por otro lado, Gieselmann y Anderson han investigado el efecto de la fuerza iónica en la formación del gel de bohemita⁵¹ y han encontrado que la formación de los geles en presencia de sales con aniones monovalentes se produce cuando se alcanza la fuerza iónica crítica, que se ve incrementada conforme aumenta el tamaño del anión.

Buining et al. investigaron la influencia del tipo de alcóxido y de la relación alcóxido/ácido en la forma y longitud finales de las fibras de bohemita.⁵² Controlando las cantidades de estos dos reactivos, fueron capaces de sintetizar fibras con una longitud entre 100 y 500 nm.

En la presente tesis doctoral se ha decidido utilizar un procedimiento sintético derivado del trabajo de Yoldas *et al.*²⁹ en la preparación de nanopartículas de bohemita. Como fuente de aluminio se empleó tert-butóxido de aluminio y para llevar a cabo la peptización se utilizó HNO₃ en relación Al³⁺/H⁺ 1/0.1 a la temperatura de 90 °C.

2.3.3. Ventajas del uso de bohemita como sistema nanoestructurado.

A la hora de escoger un material para el diseño del quimiosensor híbrido, es recomendable que sea “inerte” desde un punto de vista fotoquímico, sin embargo se deben tener en cuenta otras características o propiedades ya que como se ha intentado mostrar anteriormente, cada arquitectura presenta ventajas e inconvenientes según la aplicación final del sistema.⁵³

El análisis de los resultados previos obtenidos con diferentes oxohidróxidos metálicos nos llevó a seleccionar la forma cristalina γ del oxohidróxido de aluminio (bohemita) para realizar la presente tesis

doctoral, ya que este material cumple los requisitos necesarios y más importantes a la hora de obtener un material híbrido fluorescente con aplicaciones quimiosensoras:

1.- La bohemita es fotofísicamente inerte, es decir, es transparente a la luz visible y por lo tanto no participa en procesos de transferencia de energía y electrones.⁵⁴ Por esta razón, todas las propiedades fotoquímicas de las nanopartículas luminiscentes de bohemita vienen dadas por el quimiosensor, al contrario de lo que sucede en las matrices fotoactivas que pueden sufrir procesos de fotodescomposición como en el caso del uso de titanía⁵⁵ o simplemente causar la inhibición de la luminiscencia como en el caso de las nanopartículas de oro.⁵⁶

2.- Además, la bohemita no presenta una toxicidad intrínseca, y por esta razón, las nanopartículas de bohemita pueden ser adecuadas para aplicaciones *in vivo*, ya que no experimentan (o no son objeto) de ataque microbiano.⁵⁷ Aunque una investigación más profunda es necesaria en este contexto, estudios preliminares están de acuerdo con la naturaleza benigna de las nanopartículas de bohemita. Desde este punto de vista, los QD's presentan claras desventajas debido a sus elementos constituyentes nocivos como son el cadmio y el selenio.⁵⁸ Quizá otro aspecto relacionado con este punto, sea la posibilidad de “solubilizar” moléculas muy hidrófobas en medio acuoso.

3.- Cada nanopartícula de bohemita puede contener un gran número de unidades fotoquímicamente activas. Se ha encontrado que el grado de funcionalización de una nanopartícula de bohemita se encuentra alrededor de 2×10^{-4} moles de quimiosensor por gramo de sólido, por lo que el objetivo de obtener una partícula altamente luminiscente puede ser

cumplido fácilmente (ya que el coeficiente de extinción es igual a la suma de los coeficientes de cada cromóforo).

4.- Una vez que se han descrito las ventajas del uso de nanopartículas de bohemita, es importante analizar las vías de síntesis, ya que aunque existen varias metodologías, todas ellas comparten ciertas características: usualmente no se requiere reactivos caros, condiciones extremas, y son reacciones relativamente simples que no suponen procedimientos de separación complicados. Es más, la versatilidad de la síntesis permite el diseño de partículas luminiscentes con propiedades químicas adecuadas para las aplicaciones deseadas, incluyendo las relacionadas con experimentos *in vivo*. Estos cuatro puntos son suficientes para fomentar el uso de nanopartículas de bohemita en el diseño eficiente de quimiosensores fluorescentes.

2.4. Bibliografía.

-
- [1] a) C. Noguera, *Physics and Chemistry at Oxide Surfaces*, Cambridge University Press: Cambridge, UK, 1996. b) H. H. Kung, *Transition Metal Oxides: Surface Chemistry and Catalysis*, Elsevier: Amsterdam, 1989. c) V. E. Henrich, P. A. Cox, *The Surface Chemistry of Metal Oxides; Cambridge University Press*: Cambridge, UK, 1994. d) M. Fernández-García, A. Martínez-Arias, J. C. Hanson, J. A. Rodríguez, *Chem. Rev.*, 2004, 104, 4063.
- [2] R. W. G. Wyckoff, *Crystal Structures*, 2nd ed, Wiley: New York, 1964.
- [3] a) H. Gleiter, *Nanostruct. Mater.* 1995, 6, 3. b) M. Valden, X. Lai, D. W. Goodman, *Science*, 1998, 281, 1647. c) J. A. Rodríguez, G. Liu, T. Jirsak, Z. Chang, J. Dvorak, A. Maiti, *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 124, 5247.
- [4] a) Y. W. Jun, J. S. Choi, J. Cheon, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2006, 45, 3414. b) A. Salimi, R. Hallaj, A. Noorbakhash, S. Soltanian, *Biosensor fabrication based on metal oxides nanomaterials*, Nova Science Publishers, Inc., 2009.
- [5] a) P. Euzen, P. Raybaud, X. Krokidis, H. Toulhoat, J.-P. Jolivet, C. Froidefond, *Handbook of Porous Solids*, Wiley-VCH, Verlag GmbH, 2002, 1591. b) M. Digne, P. Sautet, P. Raybaud, P. Euzen and H. Toulhoat, *J. Catal.*, 2002, 211, 1. c) C. Arrouvel, M. Breysse, H. Toulhoat and P. Raybaud, *J. Catal.*, 2004, 222, 152.
- [6] J.-P. Jolivet, E. Tronc, L. Vayssieres, *Nanophase Materials. Synthesis, Properties, Applications*, NATO ASI Series, Applied Sciences, vol. E 260, Kluwer, Dordrecht, 1993.
- [7] J. L. Dormann, D. Fiorani, E. Tronc, *Adv. Chem. Phys.*, 1997, 98, 283.
- [8] E. Matijevic, *Chem. Mater.*, 1993, 5, 412.
- [9] J.-P. Jolivet, *Metal Oxide Chemistry and Synthesis. From solution to solid state*, Wiley, Chichester, 2000.
- [10] L. Vayssieres, C. Chaneac, E. Tronc, J.-P. Jolivet, *J. Colloid Interf. Sci.*, 1998, 205, 205.

[11] A. Pottier, S. Cassaignon, C. Chaneac, F. Villain, E. Tronc, J.-P. Jolivet, *J. Mater. Chem.*, 2003, 13, 877.

[12] E. Matijevic, *Langmuir*, 1986, 2, 12.

[13] A. Pottier, C. Chaneac, E. Tronc, L. Mazerolles, J.-P. Jolivet, *J. Mater. Chem.*, 2001, 11, 1116.

[14] a) A. E. Nielsen, *Kinetics of Precipitation*, Pergamon Press, Oxford, 1964. b) T. Sugimoto, *Adv. Colloid Interf. Sci.*, 1987, 28, 65.

[15] a) E. Ruckenstein, *Chem. Phys. Lett.*, 1978, 57, 517. b) J. Th. G. Overbeek, *Faraday Discuss. Chem. Soc.*, 1978, 65, 7. c) R. Aveyard, *Chem. Ind.*, 1987, 474.

[16] a) B. R. Baker, R. M. Pearson, *J. Catal.*, 1974, 33, 265. b) R. Tettenhorst, D. A. Holfman, *Clays and Clay Minerals*, 1980, 28, 373.

[17] C. Nedez, J.-P. Boitiaux, C. J. Cameron, B. Didillon, *Langmuir* 12, 1996, 3927.

[18] D. Mishra, S. Anand, R. K. Panda, R. P. Das, *Hydrometallurgy*, 2000, 58, 169.

[19] K. Prabhakaran, S. Ananthakumar, C. Pavithran, *J. Eur. Ceram.*, 1999, 19, 2875.

[20] V. Vatanpour, S. S. Madaeni, L. Rajabi, S. Zinadini, A. A. Derakhshan, *J. Membrane Sci.*, 2012, 401, 132.

[21] a) A. J. Downs, *Chemistry of Aluminium, Gallium, Indium and Thallium*, Blackie Academic and Professional, London, 1993. b) G. Sposito, *The Environmental Chemistry of Aluminum*, Lewis, Boca Raton, 1996. c) D. J. Chadwick, J. Whelan, *Aluminum in Biology and Medicine*, Wiley-Interscience, Chichester, 1992. d) J. T. Kloprogge, *J. Porous Materials*, 1998, 5, 5. e) C. J. Brinker, G. W. Scherer, *Sol-Gel Science: the Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*, Academic Press, New York, 1990.

[22] a) K. Wefers, G. M. Bell, *Oxides and Hydroxides of Aluminium*, Alcoa Technical Paper, No. 19, Alcoa Laboratories, 1987. b) R. B. Bagwell, G. L. Messing, *Key Eng. Mater.*, 1996, 115, 45.

[23] a) R. T. Tettenhorst, D. A. Hofmann, *Clays Clay Miner.*, 1980, 28, 373. b) R. T. Tettenhorst, C. E. Corbato, *Clays Clay Miner.*, 1988, 36, 181. c) M. Bellotto, B. Rebours, P. Euzen, *Mater. Sci. Forum*, 1998, 572. d) X. Bokhimi, J. A. Toledo-Antonio, M. L. Guzman-Castillo, F. Hernandez-Beltran, *J. Solid State Chem.*, 159, 2001, 32. e) A. E. Gobichon, B. Rebours, P. Euzen, *Mater. Sci. Forum*, 2001, 523, 378.

[24] a) H. L. Zubowa, K. Baker, H. P. Henning, U. Kretzschmar, M. Noack, U. Steinike, *Chemische Technik*, 1989, 41, 387. b) K. Streng, U. Bollmann, *Colloids Surf.*, 1991, 57, 139. c) D. L. Trimm, A. Stanislaus, *App. Catal.*, 1986, 21, 215.

[25] a) R. Brace, E. Matijevic, *J. Inorg. Nucl. Chem.*, 1973, 35, 3691. b) D. L. Carone, E. Matijevic, *J. Colloid Interf. Sci.*, 1973, 48, 291. c) W. B. Scott, E. Matijevic, *J. Colloid Interf. Sci.*, 1978, 66, 447.

[26] D. Panias, A. Krestou, *Powder Technology*, 2007, 175, 163.

[27] D. Vorkapic, T. Matsoukas, *J. Colloid Interf. Sci.*, 1999, 214, 283.

[28] a) R. Petrovic, S. Milonjic, V. Jokanovic, L. J. Kostic-Gvozdencic, I. Petrovic-Prelevic, D. J. Janackovic, *Powder Technology*, 2003, 133, 185. b) E. Morgado Jr., Y. L. Lam, L. F. Nazar, *J. Colloid Interf. Sci.*, 1997, 188, 257. c) J. Hille, U. Bollmann, W. Weinhold, H. Spindler, *Z. Anorg. Allg. Chem.*, 1990, 580, 188. d) R. K. Oberlander, L. B. Decker, US patent 4360449, 1982.

[29] B.E. Yoldas, *J. Mater. Sci.*, 1975, 10, 1856.

[30] D. Chamma, Doctoral thesis, Universite de Perpignan, France, 1999.

[31] C. E. Corbató, R. T. Tettenhorst, G. G. Christoph, *Clays Clay Miner.*, 1985, 33, 71.

[32] a) H. Christensen, N. Christensen, *Acta Chem. Scand. A*, 1978, 32, 87. b) A. Oleo, A. Szytula, A. Wanic, *Phys. Stat. Sol.*, 1970, 41, 173.

[33] J. Q. Wang, J. L. Liu, X. Y. Liu, M. H. Qiao, Y. Pei, K. N. Fan, *Sci. Adv. Mater.*, 2009, 1, 77.

[34] J. Peric, R. Krstulovic, M. Vucak, *J. Therm. Anal.*, 1996, 46, 1339.

- [35] L. Candela, D.D. Perlmutter, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 1992, 31, 694.
- [36] J. F. Hochepped, A. Karoui, V. Prevost, P Nortier, *Recent Prog. Genie Procedes*, 2001, 77, 49.
- [37] D. Mishra, S. Anand, R. K. Panda, R. P. Das, *Mater. Lett.*, 2000, 42, 38.
- [38] H. Ginsberg, W. Huttig, H. Stiehl, *Z. Anorg. Allg. Chem.*, 1961, 309, 233.
- [39] S. Music, D. Dragecivic, S. Popovic, *Mater. Lett.*, 1999, 40, 269.
- [40] X. Bokhimi, J. A. Toledo-Antonio, M. L. Guzman-Castillo, F. Hernandez-Beltran, *J. Solid State Chem.*, 2001, 159, 32.
- [41] J. Livage, *Catal. Today*, 1998, 41, 3.
- [42] X. Bokhimi, J. Sanchez-Valente, F. Pedraza, *J. Solid State Chem.*, 2002, 166, 182.
- [43] W. N. Martens, R. L. Frost, J. Bartlett, J. T. Klopogge, *J. Mater. Chem.*, 2001, 11, 1681.
- [44] E. I. Ko, *Handbook of Heterogeneous Catalysis*, Wiley, New York, 1997.
- [45] A. C. Pierre, E. Elaloui, G. M. Pajonk, *Langmuir*, 1998, 14, 66.
- [46] U. Janosovits, G. Ziegler, U. Scharf, A. Wokaun, *J. Non-Cryst. Solids*, 1997, 210, 1.
- [47] E. Etaloui, A.C. Pierre, G.M. Pajonk, *J. Catal.*, 1997, 166, 340.
- [48] D. L. Catone, E. Matijevic, *J. Colloid Interf. Sci.*, 1974, 2, 291.
- [49] S. K. Milonjic, *Mater. Sci. Forum*, 1996, 214, 197.
- [50] M. Dj. Petkovic, S.K. Milonjic, V.T. Dondur, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1995, 68, 2133.
- [51] M. J. Gieselmann, M.A. Anderson, *J. Am. Ceram. Soc.*, 1989, 72, 980.

- [52] P.A. Buining, C. Pathmamanoharan, B. H. Jansen, H. N. W. Lekkerkerker, *J. Am. Ceram. Soc.*, 1991, 74, 1303.
- [53] E. Rampazzo, E. Brasola, S. Marcuz, F. Mancin, P. Tecilla, U. Tonellato, *J Mater Chem.*, 2005, 15, 2687.
- [54] Z. Q. Yua, C. X. Wanga, X. T. Gub, *Journal of Lumin.*, 2004, 106, 153.
- [55] J.-M. Wu, T.-W. Zhang. *Langmuir*, 2005, 21, 6995.
- [56] T. L. Jennings, M. P. Singh, G. F. Strouse, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, 128, 5462.
- [57] A. Rutenberg, V. V. Vinogradovab, D. Avnir, *Chem. Commun.*, 2013, 49, 5636.
- [58] a) A. Shiohara, A. Hoshino, K. Hanaki, K. Suzuki, K. Yamamoto, *Microbiol. Immunol.*, 2004, 48, 669. b) A. P. Alivisatos, W. Gu, C. Larabell, *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 2005, 7, 55. c) J. Choi, A. A. Burns, R. M. Williams, Z. Zhou, A. Flesken-Niktin, W. R. Zipfel, U. Wiesner, A. Y. Niktin, *J. Biomed. Opt.*, 12, 2007, 064007.

3.



Objetivos.

A lo largo de los últimos años se ha producido un gran avance en la preparación, caracterización y aplicaciones de sensores ópticos basados en materiales nanoestructurados y, más concretamente en soportes nanoparticulados con distintas arquitecturas. Dentro de este marco se incluye la presente Tesis Doctoral orientada hacia el diseño, la síntesis y la caracterización de sistemas híbridos con aplicaciones medioambientales y biomédicas, cuyos objetivos principales se describen a continuación:

OBJETIVO 1: Síntesis y caracterización de nanopartículas oxídicas.

Se va a explorar la hidrólisis de alcóxidos de aluminio y silicio de cara a la obtención, por un lado de nanopartículas de γ -oxohidróxido de aluminio (bohemita), y por otro de nanopartículas con arquitectura de tipo núcleo-envoltura compuestas por un núcleo de bohemita y una envoltura de sílice amorfa.

OBJETIVO 2: Funcionalización de nanopartículas con arquitectura núcleo-envoltura para la detección de mercurio en agua.

Mediante la condensación de los grupos OH, que se encuentran en la nanopartícula, con grupos silano, se va a modificar la superficie de las nanopartículas con poliaminas de cadena abierta modificadas con unidades antraceno. Se van a sintetizar diferentes sistemas híbridos variando la cantidad de grupos amino presentes en las cadenas poliamínicas.

Los sistemas obtenidos se van a evaluar como detectores de Hg(II) en agua a diferentes pHs.

OBJETIVO 3: Funcionalización de nanopartículas de bohemita para su evaluación como agentes de contraste y sondas luminiscentes.

Los iones lantánidos poseen propiedades fotofísicas y magnéticas muy interesantes que los convierten en buenos candidatos para el desarrollo de sondas luminiscentes y agentes de contraste de imagen. Por ello, se va a explotar de nuevo la reactividad que ofrecen los grupos hidroxilo en la superficie de la nanopartículas, para anclar en su superficie dos ligandos capaces de formar complejos estables con tres cationes lantánidos: Eu(III), Tb(III) y Gd(III).

Se van a modificar químicamente las moléculas orgánicas DTPA (ácido dietilentriaminopentaacético dianhídrido) y DOTA (ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético) para poder anclarlas a la superficie de las nanopartículas de bohemita.

Los complejos de los sistemas híbridos obtenidos se van a estudiar por diferentes técnicas como agentes de contraste de imagen y sondas luminiscentes.

OBJETIVO 4: Funcionalización de nanopartículas de bohemita para la detección de sulfato en agua.

Se va a modificar la superficie de las nanopartículas de bohemita y las nanopartículas de bohemita-sílice (con arquitectura núcleo-envoltura) con diferentes moléculas orgánicas cuya estructura contiene grupos escuaramida y aminas cuaternizadas.

Se va a evaluar la capacidad de los sistemas híbridos obtenidos para detectar aniones sulfato en disolución acuosa. Los estudios de

reconocimiento se van a llevar a cabo mediante ensayos de desplazamiento utilizando como cromóforo el verde de bromocresol.

OBJETIVO 5: Síntesis de nanopartículas de bohemita para la detección de yoduro en agua.

Se van a preparar tres sistemas híbridos en los que la superficie de bohemita se va a modificar con poliaminas abiertas lineales y tripodales que contienen unidades pireno en su estructura. Con el fin de evaluar el papel que juegan las nanopartículas en el proceso de reconocimiento, se van a estudiar las moléculas orgánicas libres. Además, se van a sintetizar las moléculas orgánicas de manera que se varíe la distancia entre el fluoróforo y la superficie de las nanopartículas para ver si hay un efecto en las propiedades fotofísicas de los sistemas híbridos.

Se va a estudiar el comportamiento ácido-base de todos los sistemas mediante diferentes técnicas y se van a comparar los resultados obtenidos entre los ligandos soportados y no soportados en las nanopartículas.

Finalmente, se va a estudiar la interacción de todos los sistemas con diferentes aniones y su capacidad de detectar yoduro en agua.

4.



Material and methods.

Note: This chapter has intentionally been written in English in order to obtain the european doctoral degree.

Nota: Este capítulo ha sido escrito en inglés para la obtención del doctorado europeo.

4. 1. Nuclear magnetic resonance measurements.

Synthetic compounds were characterised by NMR using a Bruker Advance DPX 300 MHz and Bruker Advance DPX 400 MHz spectrometers located in the Central Service for Experimental Research at the University of Valencia (SCSIE, UV) operating at 299.95 MHz and 399.95 MHz for ^1H and at 75.43 MHz and 100.58 MHz for ^{13}C , respectively. Appropriate deuterated solvents were used to acquire the NMR experiments. Mnova NMR 9.0 software was used for data processing and visualisation.

3-(Trimethylsilyl)propionic-2,2,3,3- d_4 acid sodium salt was used as a reference standard for the acid-base NMR titration studies (chapter 9) ($\delta = 0$ ppm for ^1H and $\delta = 0$ ppm for ^{13}C).

Adjustments to the desired pH values were done using drops of DCl or NaOD solutions. The pD was calculated from the measured pH values using the correlation, $\text{pH} = \text{pD} - 0.4$.¹

^{29}Si NMR studies were carried out on a Varian UNITY 300 spectrometer at a resonance frequency of 59.59 MHz. The MAS NMR spectra were recorded with a 7 mm zirconium oxide rotor spinning at 4.5 kHz. A 90° single-pulse was used with an acquisition time of 0.08–0.1 s and a delay time of 30–60 s. Chemical shifts were measured relative to tetramethylsilane (TMS).

^{27}Al NMR spectra were recorded on a Bruker Avance 400 spectrometer at a resonance frequency of 104.26 MHz. Relaxation delay times of 1–5 s and acquisition times of 0.4 s were used.

4. 2. Melting point.

Melting points were performed in a Reider equipment (SCSIE, UV).

4. 3. C, H, N analysis.

C,H,N elemental analysis of the synthesised compounds were done with an EA1108 CHNS-O Carlo-Elba equipment (SCSIE, UV). The measurements were carried out twice and the final values are the average.

4. 4. Spectrometric measurements.

Synthesized compounds were characterized by mass spectrometry in an ESQUIRE 3000 PLUS Ion Trap mass spectrometer (SCSIE, UV) attached to an AGILENT 1100 (HPLC-MS) high-performance liquid chromatograph.

4. 5. Powder X-ray diffraction.

The XRD investigation was performed using a D-500 diffractometer with a graphite monochromator for filtering Cu-K α radiation ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$), with a divergence slit angle of 1° , an antiscatter slit angle in the diffracted beam of 1° , and a receiving slit width of 0.5 mm (SCSIE, UV).

Powdered samples were sprayed on glass sample holders and the data collected in Bragg–Brentano geometry. A reference pattern, used for evaluating instrumental XRD line broadening, was recorded from lanthanum hexaboride (NIST standard reference material 660a).

Core-shell silica-boehmite samples were recorded for diffraction angles in the 5-65° 2 θ range with a step-size of 0.02° 2 θ and a counting time of 5 s per step.

Boehmite samples were recorded for diffraction angles in the 15-65° 2 θ range with a step-size of 0.08° 2 θ and a counting time of 3 s per step.

4.6. Infrared transmission spectra.

Measurements were obtained with a Perkin Elmer spectrometer Model 882 in the 400–1400 cm⁻¹ range using the KBr pellet method.

4.7. Transmission electron microscopy.

The morphology of as-prepared and sensor-containing boehmite particles was examined using a Jeol 1010 transmission electron microscope at an accelerating voltage of 100 kV (SCSIE, UV).

Samples were prepared by dispersing as-produced powders in absolute ethanol and setting dropwise on copper grids that had previously been coated with a holey thin carbon film.

4.8. Energy dispersive X-ray.

The chemical composition of the nanoparticles was analysed using an energy dispersive X-ray (EDX) spectrometer attached to a high-resolution scanning electron microscope. The EDX spectra of the two types of nanoparticles (based on DO3A or DTPA chelating moieties) were performed at least ten times at different spots for each sample.

Table 4.1. X-ray emission values (KeV) of the elements investigated in chapter 7.

	K_{α}	K_{β}	K_{ab}	L_{α}	$L_{\beta 1}$	$L_{\beta 2}$	M
C	0.277	0.284					
O	0.523	0.532					
Si	1.740	1.829	1.840				
Al	1.486	1.553	1.560				
Eu				5.845	6.455	6.842	1.131
Gd				6.056	6.712	7.102	1.185
Tb				6.272	6.977	7.365	1.240

4.9. Thermal analysis.

Simultaneous thermogravimetric and differential thermal analyses were carried out on a Setaram TG-DTA 92 thermobalance using 20 mg of sample. A vacuum purge of atmospheric air was done before starting the experiments.

4. 10. Potentiometric measurements.

Potentiometric studies were carried out using a potentiometer controlled by a Pentium Dual-Core E5300 personal computer.² The burette control and data acquisition were performed with the computer program PASAT.³

The glass electrode was calibrated previously to each titration. The calibration was done as a hydrogen-ion concentration probe by titration of standardized amounts of HCl with CO₂-free NaOH solution. The equivalent point was determined by the Gran's method,⁴ which gives the standard potential, E^0 , and the ionic product of water ($pK_w = 13.73(1)$). A Wilhelm bridge filled with 0.5 M NaCl was used to separate the glass electrode (Crison 52 50 Ag/AgCl) and the reference electrode (Crison 52 40 Ag/AgCl in 0.5 M NaCl solution).

Potentiometric titrations were carried out at 298.1 ± 0.1 K using NaCl 0.15 M as supporting electrolyte and under Ar atmosphere. The pH range investigated was 2.5-11.0 and the corresponding ion and ligand concentrations ranged from 1×10^{-3} to 5×10^{-3} M.

The HYPERQUAD program was used to fit the protonation and stability constants.⁵ The different titration curves for each system were treated as separated curves. When more than one model fits the experimental data, the most reliable chemical model was chosen by performing F tests at the 0.05 confidence level.⁶ Finally, the sets of data were merged together and treated simultaneously to give the final stability constants. The HYSS programme was used to plot the distribution diagrams of species.⁷

4. 11. Steady-state fluorescence.

Steady-state fluorescence spectra were measured with a spectrofluorometer (PTI), equipped with a lamp power supply LPS-220B, MD-5020 and an 814 Photomultiplier Detection System working at room temperature.

All the samples were measured under the same conditions: $OD_{\text{excitation wavelength}} = 0.3$ in aqueous solution, using $1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$ path length quartz cuvettes at $298.1 \pm 0.1\text{K}$ in pure water. Adjustments to the desired pH value were done using drops of HCl or NaOH solutions. The fluorescence emission were corrected taking into account the absorbance at the excitation wavelength and the minimum dilution originated by the adjustment of the pH.

Table 4.2. Excitation and emission wavelengths of fluorophores used in the thesis.

Signalling unit	λ_{exc} (nm)	λ_{emis} (nm)
Anthracene	350	416
Pyrene	340	374

4. 12. Time-resolved measurements.

Measurements were made with a Time Master fluorescence lifetime spectrometer TM-2/2003 from PTI. Sample excitation was afforded by PTI's own GL-3300 nitrogen laser. The kinetic traces were fitted by monoexponential decay functions and reconvolution of the instrument response. The accuracy of the fits was evaluated by the reduced χ^2 values as close to 1 as possible.

4. 13. Laser flash photolysis.

Experiments were carried out by using the third harmonic (355 nm) of a Q-switched Nd:YAG laser.

4. 14. Quantum yield.

Measurements were determined in deaerated medium using the quantum yield measurement system from Hamamatsu model C9920-0 by direct method.⁸ The system is made up of an excitation light source, consisting of a xenon lamp linked to a monochromator, an integration sphere, and a multichannel spectrometer. Also, the fluorescence quantum yield has been measured by the comparative method using pyrene in EtOH solution as a reference,⁹ obtaining similar results in both cases.

4. 15. Detection limit.

The detection limit (DL) can be defined as the lowest quantity of a substance that can be distinguished from the absence of that substance (a blank value) and generally is calculated as 3 times the standard deviation of the blank. This value depends on the instrumentation and on the sensitivity of the ligand.

Regarding with the sensitivity of the equipment, the detection limit is related to the capability of the instrument to distinguish a peak intensity from the fluctuations of the background noise. The signal-to-noise (SNR)

ratio gives you a quantitative indication of the sensitivity of the measurements and it can be calculated from the raman spectrum of water measured in the following experimental conditions (700 in our case).

Emission Spectra	
Start	370 nm
Stop	450 nm
Excitation	350 nm
Step Size	0.5 nm
Integration	1 second

The sensitivity of the ligand can be understood as the slope obtained by the fitting of the maximum experimental emission intensities of fluorescence *versus* the substrate's concentration added to the solution.

Using these two parameters, the detection limit can then be calculated as follows:

$$DL = 3 * \frac{SNR}{slope}$$

4. 16. Ultraviolet-visible measurements.

Spectra of the samples containing the ligand and the complexes in concentration 1×10^{-3} M were recorded in an Agilent 8453 spectrometer UV-vis.

All titrations performed in chapter 8 were carried out at 25 °C in pure water. Bromocresol green (1.48×10^{-5} M) was prepared in a HAc-NaAc

buffer (0.016 M). These conditions were used for the titrations of all systems and also for the indicator displacement assays (IDA) with the anions. The solution was buffered at pH 3.4 with a HAc-NaAc buffer. This pH value was chosen to keep the solution close to the beginning of the colour change transition from the acidic (phenolic) to the basic (phenolate) form of BG. The constancy of the pH throughout the titrations was checked for all the experiments.

4.17. Measurement of q value.

Lifetimes of Eu(III) and Tb(III) complexes were measured by excitation (332 nm) of the sample using a short pulse of light followed by monitoring the integrated intensity of light (616 nm for Eu(III), 545 nm for Tb(III)) emitted during a fixed gate time, t_g , after a delay time, t_d . A gate time of 0.1 ms was used, and the excitation and emission slits were set to 10 nm and 5 nm band-pass respectively. All the samples were vacuum-dried before dissolved in H₂O and D₂O to ensure no H₂O was trapped in complexes.

The obtained exponential decay curves were fitted with the following equation:

$$I = A_0 + A_1 e^{-kt}$$

where: I is the intensity at time t after the flash.

A_0 is the intensity after the decay has finished.

A_1 is the pre-exponential factor.

k is the rate constant for the decay of the excited state.

The excited state lifetime, τ , is the inverse of the rate constant, k .

The number of first sphere coordinated water molecules (q value) of Eu(III) complex and Tb(III) complex was calculated based on their luminescence lifetime in H₂O and D₂O from the following two equations.¹⁰

$$q_{Eu(III)} = \frac{1}{2} \left[\left(\frac{1}{\tau_{H_2O}} - \frac{1}{\tau_{D_2O}} \right) - 0.25 \right]$$

$$q_{Tb(III)} = 5 \left[\left(\frac{1}{\tau_{H_2O}} - \frac{1}{\tau_{D_2O}} \right) - 0.06 \right]$$

where: τ_{H_2O} is the luminescence lifetime in H₂O (in milliseconds).

τ_{D_2O} is the luminescence lifetime in D₂O (in millisecond).

4.18. Magnetic resonance imaging.

The measurements were performed on a whole body 1.5 T GE Excite MR scanner (63 MHz, 25 °C). Inversion–recovery spin echo pulse sequences (TE 8.8 ms/TR 10000 ms/TI 50–4000 ms) were used for T_1 measurements. The values of T_1 were plotted against several gadolinium concentrations obtained by ICP-MS measurements.

4.19. Nuclear magnetic relaxation dispersion.

These experiments were measured by the Éva Tóth's group in the Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS, in France.

$1/T_1$ Profiles of the Gd(III) complexes were recorded on a Stellar SMARtracer FFC fast-field-cycling relaxometer covering magnetic fields from 2.35×10^{-4} T to 0.25 T, which correspond to a proton Larmor

frequency range of 0.01–10 MHz. The relaxivity at higher fields was recorded using a Bruker WP80 adapted to variable field measurements and controlled by the SMARtracer PC-NMR console. The temperature was controlled by a VTC90 temperature control unit and fixed by a gas flow. The temperature was determined according to previous calibration with a Pt resistance temperature probe.

NMRD profiles were recorded in solutions containing 0.1% (w/w) xanthan gum (0.1 mM Gd(III), pH 7.4 in 0.02 M HEPES buffer). For GdDTPA–boehmite, we also measured relaxivities in aqueous suspension of the nanoparticles (~1 mM Gd(III), pH 7). Following sonication, this aqueous suspension remains stable for ~30 min when sedimentation starts to appear. The solutions containing the xanthan gum are stable and give reproducible relaxivities for an extended period of time.

4.20. Variable temperature ^{17}O NMR transverse (T_2) relaxation time.

These experiments were measured by the Éva Tóth's group in the Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS, in France.

The measurements were carried out on a Bruker Avance 500 spectrometer in aqueous solutions of the Gd(III) complexes. They were referenced to a solution containing the same nanoparticle at identical concentration and pH where the Gd(III) ions were replaced by the diamagnetic Y(III). Transverse ^{17}O relaxation times (T_2) were obtained by the Carr–Purcell–Meiboom–Gill spin-echo technique.¹¹ To improve sensitivity in ^{17}O NMR, ^{17}O -enriched water (10% H_2^{17}O , Cortecnet) was added to the solutions to yield around 1% ^{17}O enrichment. The temperature was calculated according to previous calibration with ethylene glycol and

methanol.¹² The concentration of the samples was ~1mM in Gd(III), pH = 7.

4.21. Laser confocal microscopy.

These experiments were measured by the Éva Tóth's group in the Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS, in France.

Human HeLa cells were seeded on glass coverslips and grown in DMEM (Sigma Chemical Co.; St Louis, MO) supplemented with 10% fetal bovine serum (Linus, Spain), 4.5 g/L glucose, L-glutamine, 500 U/mL penicillin/streptomycin and 20 mM HEPES (Biowhitaker, Walkersville, MD). When reached confluence, monolayers were incubated with a suspension of fresh medium containing 100 μ M of europium or terbium particles for 4 hours. Then, coverslips were extensively washed and fixed with 4% paraformaldehyde in PBS. Immunofluorescence staining was performed as previously described.¹³ Anti-CD44 (HP2/9) (a cell-surface glycoprotein involved in cell-cell interactions, cell adhesion and migration), generated in our laboratory at CNIC, was used as primary antibody. Goat anti-mouse Alexa 647 (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA) was employed as secondary antibody. Next, samples were mounted using Prolong (Molecular Probes). Series of optical sections were obtained with a Leica TCS-SP5 confocal laser scanning unit (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany), using a 63x oil immersion objective (NA 1.4), a 405 nm diode for the nanoparticles excitation and a 633 nm laser line for Alexa 647 visualization. Images were analyzed using Leica Confocal Software.

4.22. Flow cytometry analysis.

These experiments were measured by the Éva Tóth's group in the Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS, in France.

Human HeLa cells were cultured and incubated with lanthanides as described above. Then, cells were trypsinized and washed in PBS, followed by incubation with annexin-V Alexa 647 (Molecular Probes) for 15 min at room temperature. Finally propidium iodide was added to a final concentration of 0.001% and samples were analyzed in a flow cytometer (FACSCanto™ II, BD Biosciences). Cells were subdivided in 4 categories: negative for both stainings (viable), positive for propidium iodide (early apoptotic), double positive (intermediate apoptotic) and only positive for annexin V (necrotic).

4.23. References.

[1] A. K. Covington, M. Paabo, R. A. Robinson, R. G. Bates, *Analytical Chemistry*, 1968, 40, 700.

[2] E. García-España, M. J. Ballester, F. Lloret, J. M. Moratal, J., Faus, A. Bianchi, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1988, 101.

[3] M. Fontanelli, M. Micheloni, *Proceedings of the I Spanish-Italian Congress on Thermodynamics of metal Complexes*, Peñíscola, Castellón, Spain, 1990.

[4] a) G. Gran, *Analyst*, 1952, 77, 661. b) F. J. Rossotti, H. Rossotti, *J. Chem. Ed.*, 1965, 42, 375.

[5] P. Gans, A. Sabatini, A. Vacca, *Talanta*, 1996, 43, 1739.

[6] a) L. Bologni, A. Sabatini, A. Vacca, *Inorganica Chimica Acta-Articles* 1983, 69, 71. b) W. C. Hamilton, *Statistics in physical science. Estimation, hypothesis testing, and least square*, New York: Ronald Pres, 1964.

[7] L. Alderighi, P. Gans, A. Ienco, D. Peters, A. Sabatini, A. Vacca, *Coord. Chem. Rev.*, 1999, 184, 311.

[8] L. Porres, A. Holland, L.-O. Palsson, A. P. Monkman, C. Kemp, A. Beeby, *J. Fluoresc.*, 2006, 16, 267.

[9] I. B. Berlman, *Handbook of Fluorescence Spectra of Aromatic Molecules*, 2nd ed.; Academic Press: New York and London, 1971; p 473.

[10] R. M. Supkowski, W. D. Horrocks, Jr., *Inorg. Chim. Acta*, 2002, 340, 44.

[11] S. Meiboom, D. Gill, *Rev. Sci. Instrum.*, 1958, 29, 688.

[12] D. S. Raiford, C. L. Fisk, E. D. Becker, *Anal. Chem.*, 1979, 51, 2050.

[13] O. Barreiro, M. Yañez-Mo, M. Sala-Valdes, M. D. Gutierrez-Lopez, S. Ovalle, A. Higginbottom, P. N. Monk, C. Cabañas, F. Sanchez-Madrid, *Blood*, 2005, 105, 2852.

5.

Synthesis and characterization.



Note: This chapter has intentionally been written in English in order to obtain the european doctoral degree.

Nota: Este capítulo ha sido escrito en inglés para la obtención del doctorado europeo.

5.1. Synthesis of nanoparticles.

5.1.1. Sol-gel procedure.

In order to obtain the nanoparticles used in this thesis with a high degree of purity, a sol-gel route was chosen. Furthermore, this procedure allowed to control the hydrolytic steps present in the mechanism.¹

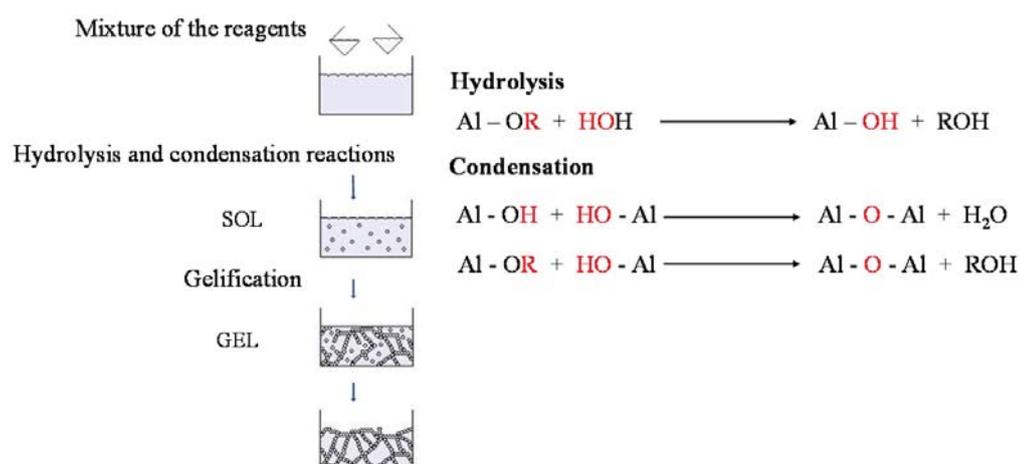


Figure 5.1. Typical sol-gel process by hydrolysis of a metallic alcoxide.

In a typical sol-gel protocol (figure 5.1), the process starts with a solution consisting of metal compounds, such as a metal alcoxide, acetylacetonate, carboxylate or a soluble inorganic salt as the source of cations. Additional reactants can include water as the hydrolytic agent, an alcohol as the solvent, and an acid or a base as the catalyst. Metal compounds undergo hydrolysis and polycondensation giving rise to a sol, in which polymers or colloidal particles are dispersed without precipitation. Further reaction connects the fine particles, solidifying the sol into a wet gel, which still contains water and solvents. Removal of solvents and water produces a dry gel. Depending on the characteristics of the final product we are looking for, it can be necessary to apply high

temperatures to the gel. By doing so, organic constituents and residues are removed, giving rise to microstructures of inorganic-inorganic composites.

5.1.2. Synthesis of boehmite nanoparticles.

Colloidal dispersions of boehmite particles with a narrow size distribution have many applications in adsorbents, catalysts and alumina powder production, pollution control, microelectronics and separation technology.¹ The potential application of boehmite sols is in production of materials with enhanced physical properties,² which could be produced as bulk articles or coatings using proper techniques (e.g. deep coating, electrophoretic deposition,³ etc.).

5.1.2.1. Experimental procedure.

Boehmite synthesis was achieved in a two-step procedure.⁴ In the first step, deionized water (282 mL) is heated at 80 °C in a round bottom flask. Then, aluminium s-butoxide (38.6 g) was added resulting in a 100:1, water:aluminium s-butoxide, molar ratio. The addition must be done very quickly in order to avoid the formation of Al(OH)₃. After the alkoxide addition, an exothermic reaction took place and a gel was formed almost immediately. The mixture was stirred vigorously for 1 h and the temperature was increased until 90 °C. The second step, a peptization process, was carried out adding nitric acid (1.75 mL) in a 0.15:1, HNO₃:alkoxide molar ratio and the solution was kept at 95 °C for 4 days. Finally, the solvent was evaporated and the solid was dried in an oven at 120 °C for 48 h.

5.1.2.2. Characterization.

The composition, the size, the shape and the homogeneity of the final nanoparticles obtained were characterized by different techniques:

- *Powder X-ray diffraction.* The material presents peaks at 14.18, 28.18, 38.18, 48.98, 55.14, 63.96 and 65.08 values of $2\theta^\circ$, which are characteristic of the boehmite structure. The peaks present in the diffractogram (figure 5.2) are broad due to the small size of the particles.

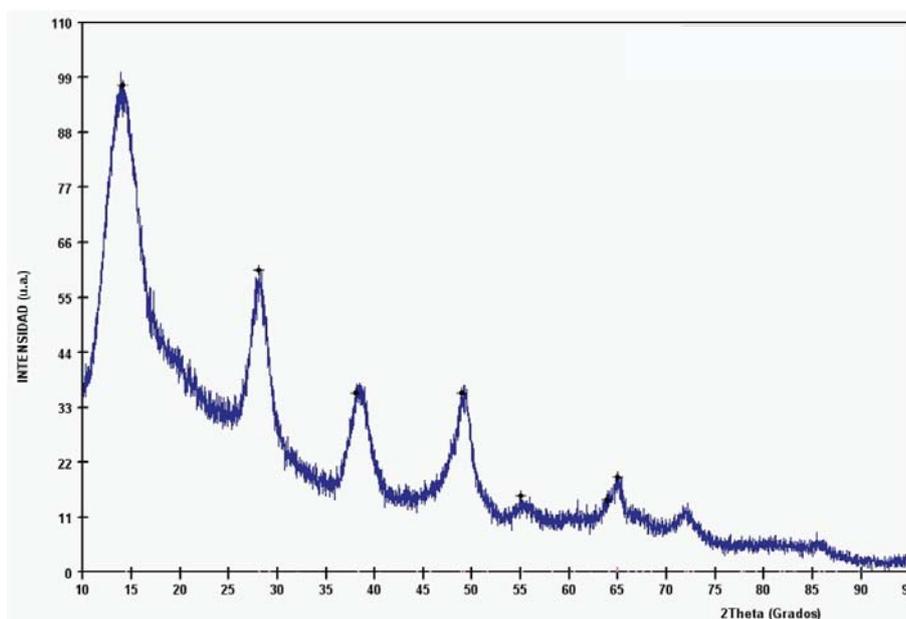


Figure 5.2. Powder X-ray diffraction spectra of boehmite nanoparticles. (cross symbols indicate the characteristic peaks of γ -AlO(OH)).

- *Infrared spectra.* The samples present a peak at 1650 cm^{-1} that corresponds with the hydration water of the sample (figure 5.3). At 3200 cm^{-1} and 3700 cm^{-1} appear the stretching vibrations of the Al-OH bonds. These peaks are typically overlapped with the presence of water in the sample. For the characterization of the Al-OH bonds a band present in 1060 cm^{-1} and 1080 cm^{-1} range is necessary, that corresponds to the

bending vibration, and a small shoulder at 450 cm^{-1} originated by octahedral coordinated Al ions. Finally, it is possible to observe a band situated around 1400 cm^{-1} attributable to de NO_3^- group. This band is originated by the nitric acid used in the peptization process.^{5,6}

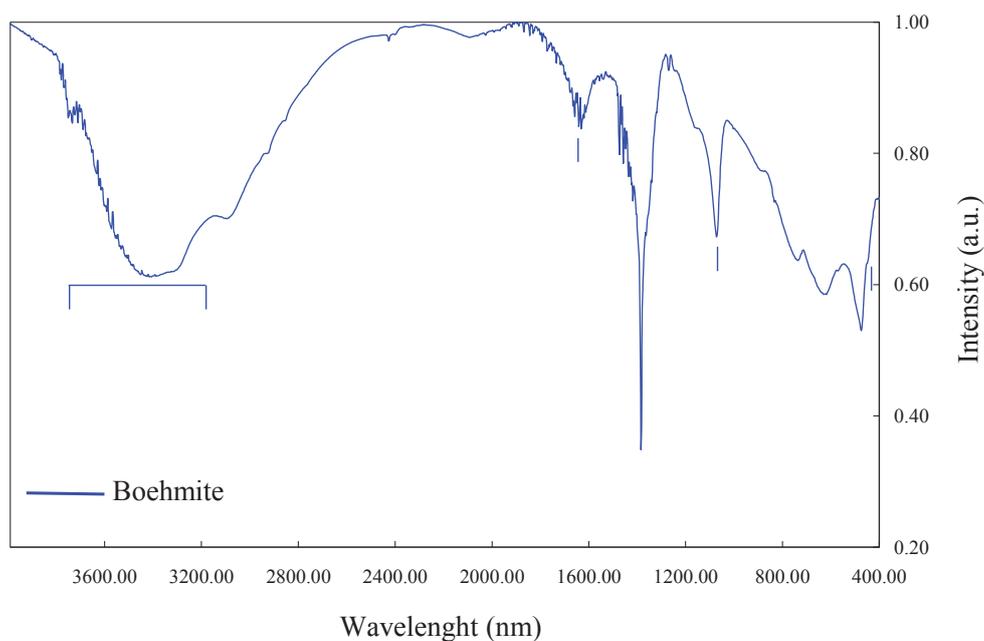


Figure 5.3. Infrared spectra of $\gamma\text{-AlO}(\text{OH})$.

- *Transmission electron microscopy.* The experimental procedure followed in this thesis has allowed to obtain nanoparticles with an average size of 15-20 nm (figure 5.4), a high degree of homogeneity and furthermore, without aggregates.

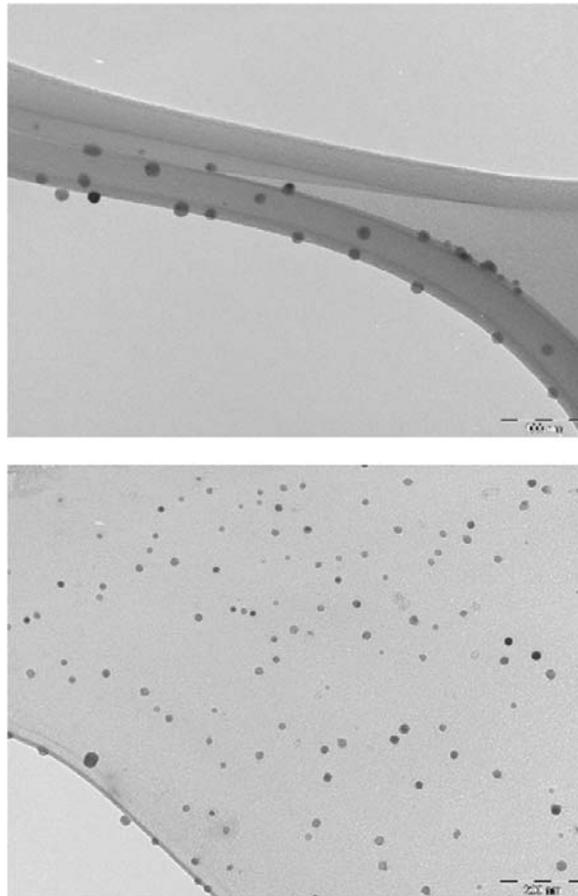


Figure 5.4. TEM images of the boehmite nanoparticles (bar = 100 nm in the figure above and 200 nm at the bottom).

- *Thermal analysis.* The representative behaviour of the thermal decomposition of boehmite nanoparticles is depicted in figure 5.5. The dehydration appears to occur in three main steps. The first one that finishes at 200 °C, corresponds to the dehydration reaction of physisorbed water molecules and corresponds to a weight loss of about 5-9%. The second step gives a broad unsymmetrical endothermic peak, ends before 500 °C and represents the major part of the mass loss, about 20-25%. This step is associated with the dehydration and boehmite transformation into γ -alumina. Finally, it is possible to observe a last step that does not give a thermal event but appears as a continuous mass loss of about 3%, and

seems to stop at about 800 °C. This mass loss is assigned to the continuous dehydroxylation of the surface of the transition alumina.⁷

The shape of these curves has been found to be closely related to the crystal size of boehmite.⁸ The first peak is not observed for crystals larger than 50 nm. The second peak becomes sharper as the crystal size increases and is shifted towards higher temperatures^{8b}. In some papers,⁹ to explain the asymmetrical profile of the second peak, an additional step is considered, attributed to the removal of chemisorbed water before the conversion into transition alumina.

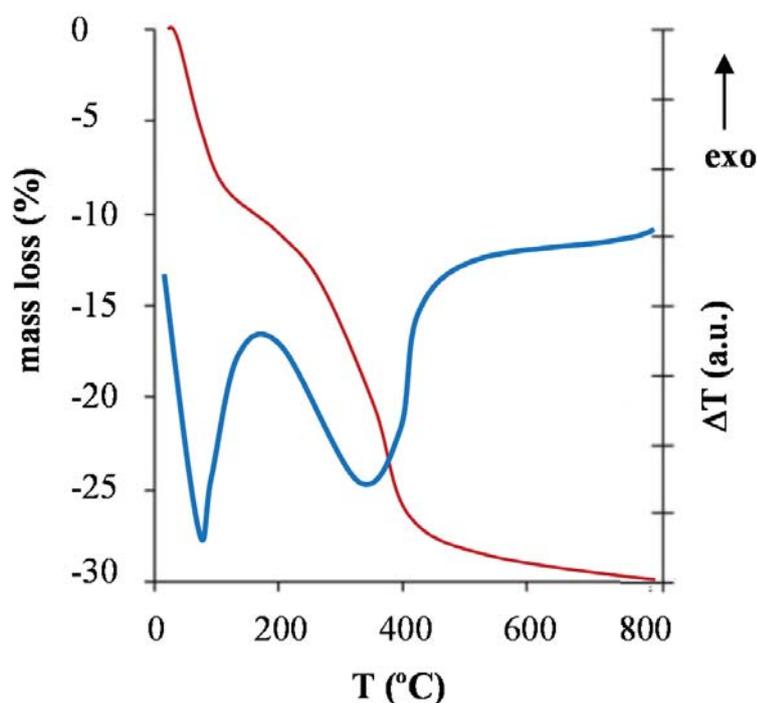


Figure 5.5. TGA-DTA curve of a boehmite nanoparticles sample (N₂ flow of 1.5 L/h, heating rate = 120 °C/h).

5.1.3. Synthesis of boehmite-silica core-shell nanoparticles.

Mullite-based materials have received much attention in the last decades. It is an essential component in traditional ceramic materials such as porcelain, but is also a crucial component for ceramic materials with specific properties and applications.¹⁰ Mullite is the only crystalline phase within the binary system $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-SiO}_2$ ¹¹ and is obtained by thermal treatment of the monofasic gels precursors which are composed by a boehmite core surrounded by a shell made of silica.

In order to obtain these core-shell nanoparticles, sol-gel techniques have been used. There are different synthetic approaches to achieve this goal. The first, named all-alkoxide, is based on the controlled hydrolysis of aluminium and silicon alkoxides. In the second, named semi-alkoxide method, the aluminium source is a salt, usually nitrate nonahydrate. The disadvantage of the alkoxides is their low solubility in water and alcohols. In addition hydrolysis of the Al alkoxides is faster than tetraethylorthosilicate (TEOS) and it is difficult to control gelation and phase separation of bayerite or pseudo-boehmite gel may occur. Aluminium acetate, formiate and similar compounds also hydrolyze quickly and they cannot be dissolved completely in water or alcohol and gel into two separated layers. However, with the semialkoxide method inexpensive aluminium salts are used and higher homogeneity is reached, as evidenced by the lower temperature formation of mullite, at around 1000 °C. Among the inorganic salts we have selected aluminium nitrate because has a good solubility in ethanol. Another reason for this choice was that the major part of NO_3^- content can easily escape during gelation.

5.1.3.1. Experimental procedure.

The core-shell nanoparticle platform was achieved by condensation of TEOS and $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ in ethanol, followed by aging for one week. The starting aluminium and silicon sources were aluminium nitrate and TEOS, respectively. The gel was prepared by dissolving $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (28.4 g) in ethanol (36.0 mL) under refluxing for 2 hours. After that, the required amount of tetraethylorthosilicate was slowly added to the previous aluminium solution. The final molar ratio $\text{Al}^{3+}:\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ was 1:12. The proper amount of H_2O for hydrolysis and condensation of tetraethylorthosilicate and aluminium salt was added by way of water of hydration of aluminium nitrate nonahydrate. The resulting solution was refluxed and aged for 1 week. The finally obtained gels were dried at 60 °C for 12 h and at 120 °C for a further 12 h. The nature of the prepared nanoparticles was assessed by different techniques.

5.1.3.2. Characterization.

- *Powder X-Ray diffraction.* The diffraction spectra indicates the presence of boehmite as a crystalline phase (figure 5.6). The X-ray displays peaks at around 13.6, 28.3, 38.4, 49.2 and 64.81 values of $2\theta^\circ$ which can be attributed to a crystalline phase with the structure of boehmite. The second component of these synthesised nanoparticles, i.e. silica, which is amorphous, is evidenced by the absence of peaks corresponding to any crystalline form of silica.

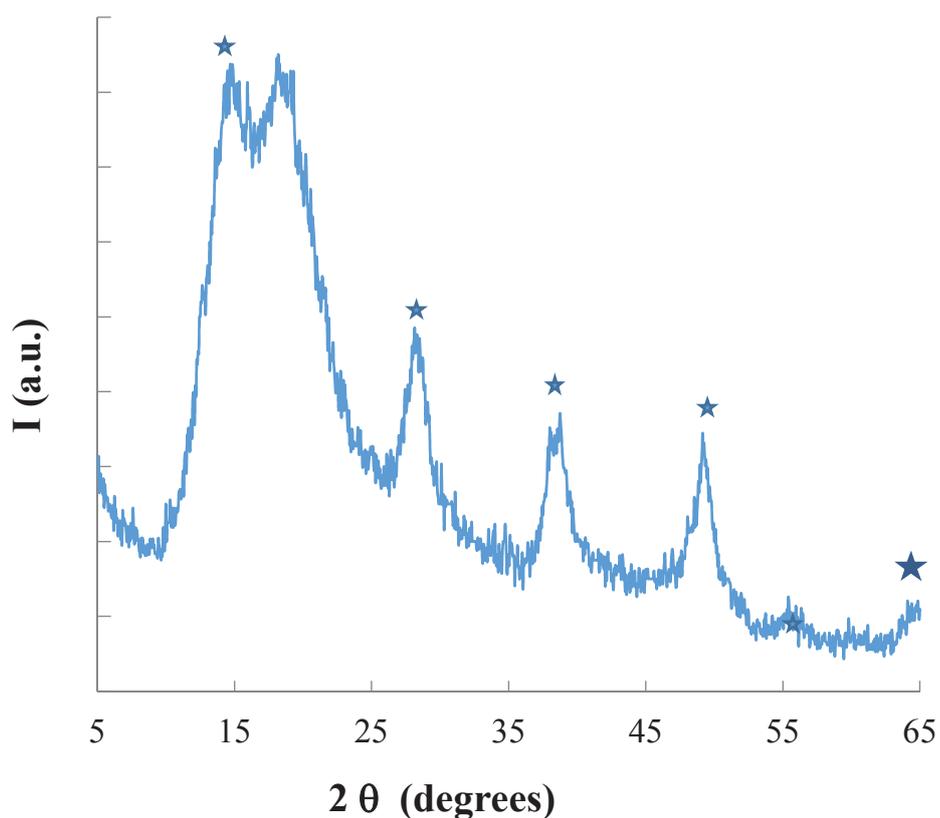


Figure 5.6. X-ray powder diffraction pattern of the boehmite-silica core-shell nanoparticles.

- *²⁷Al Nuclear magnetic resonance.* There are three types of environments: tetra-, penta- and hexa-coordinate aluminium sites, which present signals in the range 50–80, 30–40 and (–10) to (+15) ppm respectively¹². The appearance of a signal at 3 ppm suggests that in our nanoparticles the Al is predominantly hexacoordinated. Small peaks from tetracoordinated and pentacoordinated aluminium are also present (figure 5.7).

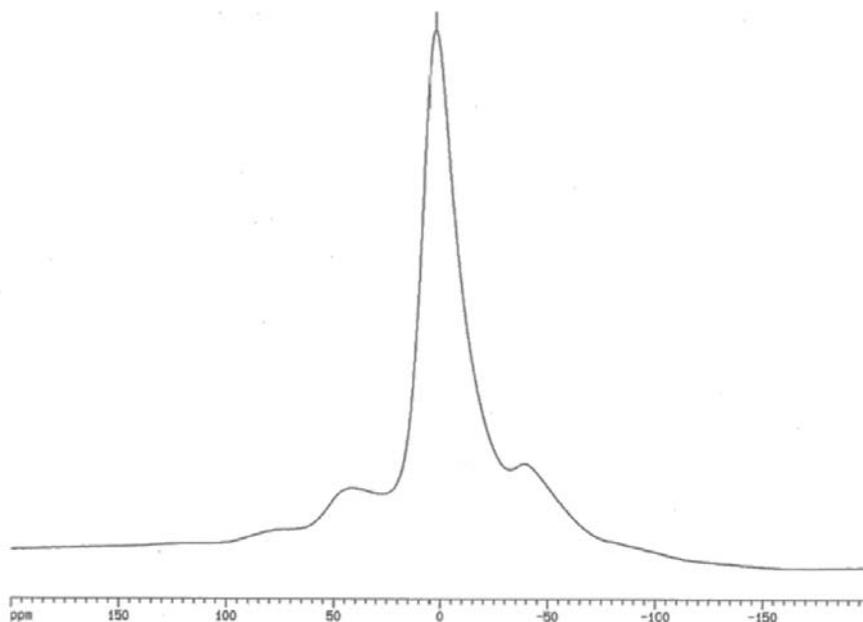


Figure 5.7. ^{27}Al NMR of core-shell nanoparticles.

- ^{29}Si Nuclear magnetic resonance. The ^{29}Si NMR spectrum shows a peak located at around -80 ppm (figure 5.8) that corroborates the presence of Si atoms with a tetrahedral coordination.

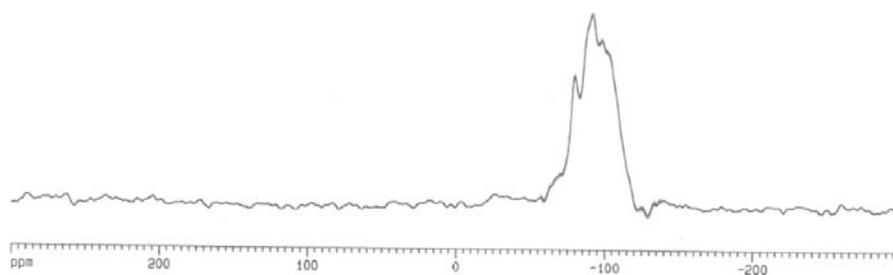


Figure 5.8. ^{29}Si NMR of core-shell nanoparticles.

• *Infrared spectra.* Figure 5.9 shows the FT-IR spectra of boehmite (dashed), amorphous silica (dotted)¹³ and non-functionalised core-shell crystalline boehmite-amorphous silica nanoparticles.¹⁴ All the spectra were put together in order to compare the presence of the bands corresponding to boehmite and silica materials in the final nanoparticles. Amorphous silica is only going to be discussed here, as the IR spectrum of boehmite was discussed before (*vide supra*).

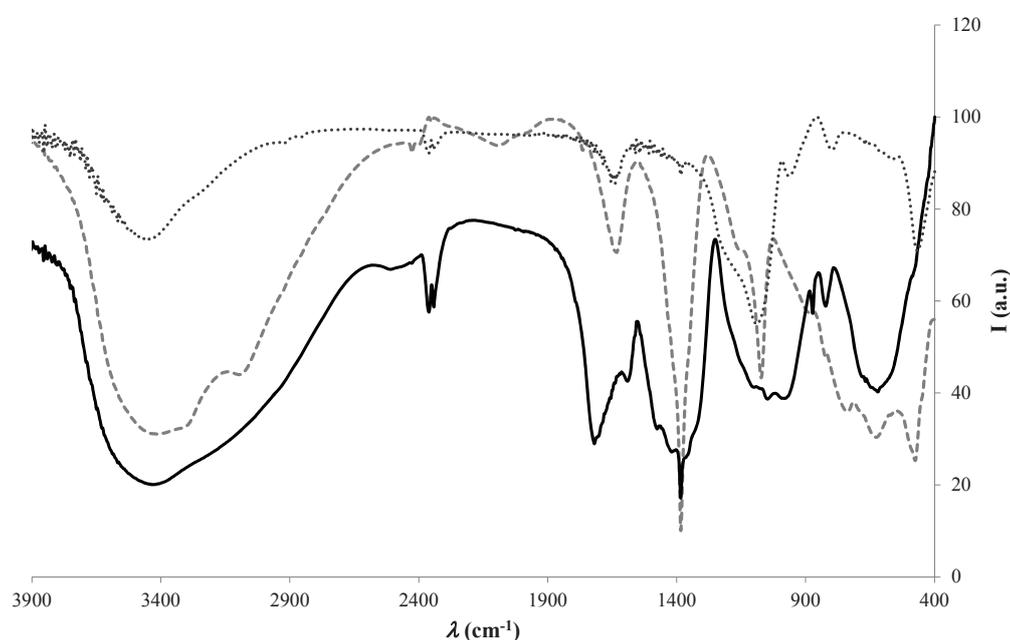


Figure 5.9. IR spectra for boehmite (dashed), amorphous silica (dotted) and non-functionalised core-shell nanoparticles.

The IR band at 3437 cm^{-1} is due to the stretching vibration of H_2O molecules. Correspondingly, the IR band at 1632 cm^{-1} is due to the bending vibration of H_2O molecules. The very strong and broad IR band at 1100 cm^{-1} with a shoulder at around 1200 cm^{-1} is usually assigned to the Si-O-Si asymmetric stretching vibrations. The IR band at 956 cm^{-1} can be assigned to silanol groups. The IR band at 800 cm^{-1} can be assigned to

Si-O-Si symmetric stretching vibrations, whereas the IR band at 464 cm^{-1} is due to O-Si-O bending vibrations.

As it can be seen in figure 5.9, the spectra of the core-shell nanoparticles display broad bands at low wavenumbers, indicating a disordered distribution of aluminium and silicon tetrahedral sites. The band placed at around 1000 cm^{-1} has been assigned to tetrahedral Al-O-Si bands. This assignment has been made taking into account that the introduction of Si-O-Al bonds in a SiO_2 matrix shifted the absorption band of Si-O toward lower wavenumbers.¹⁵

- *Transmission electron microscopy.* In the figure 5.10 are shown some TEM pictures of the core-shell nanoparticles. The average size is around 10 nm, with high homogeneity in size and shape. Unfortunately it is difficult to evidence the thin layer of silica by TEM examination.

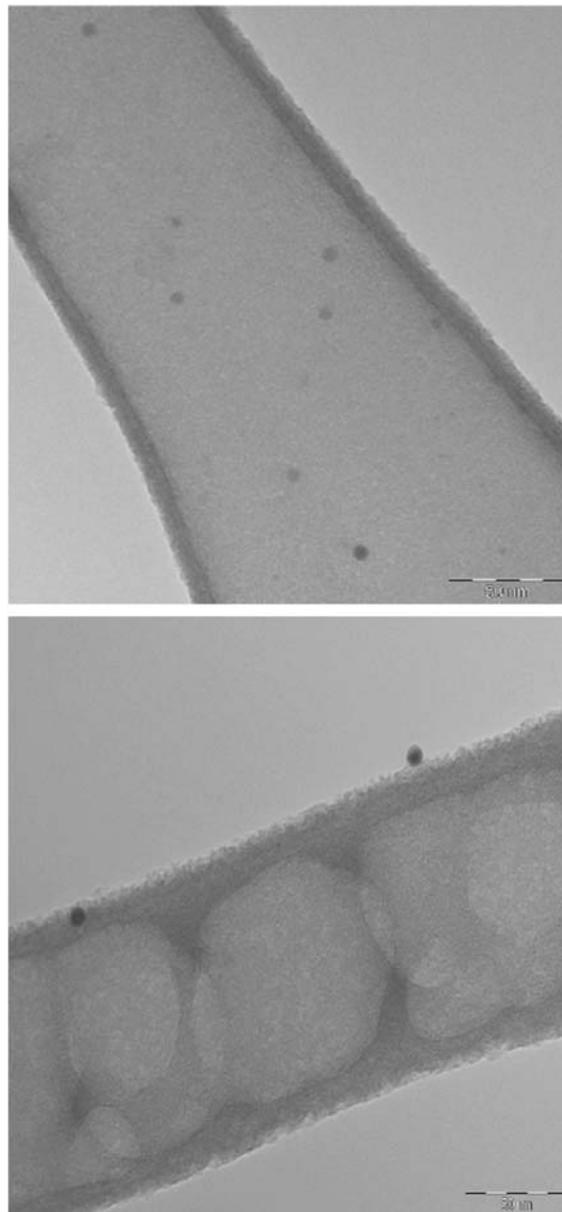


Figure 5.10. TEM images of the synthesized boehmite-silica nanoparticles, bar = 50 nm.

5.2. Synthesis of inorganic-organic systems.

5.2.1. General procedure for nanoparticles surface functionalization.

The anchoring of the organic molecules to the surface has been achieved by direct condensation of the OH groups located around the surface of the particles, and the hydrolysable alkyl groups bonded to the silicon atom attached to the organic molecules (figure 5.11).

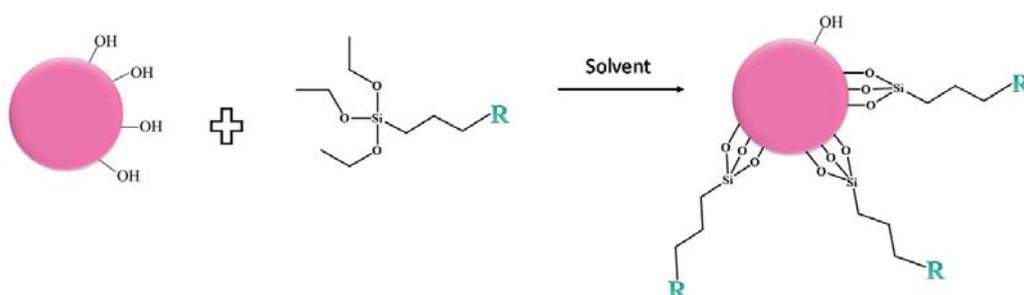


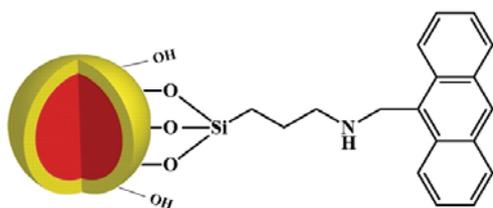
Figure 5.11. Schematic experimental procedure for the functionalization of the nanoparticles surface.

The controlled hydrolysis of the precursors and the later condensation with the OH groups located on the surface of the nanoparticles, gave the hybrid materials. Extensive washing of the materials was successively performed with dichloromethane, ethanol, and mixtures of ethanol:water.

5.2.2. Synthesis of anthracene core-shell hybrid systems.

The synthetic approach used to anchor the organic molecules to the surface of the nanoparticles consists of a two-step procedure. In the first step, 9-anthracene-1-carboxaldehyde is reacted with the corresponding precursor tris(alkoxy)polyaminosilane to yield the Schiff bases which are characterized by a downfield shifted ^1H NMR signal at *ca.* 8.4 ppm attributable to the imine-type proton. The imines are reduced with sodium borohydride to give the corresponding functionalised fluorophoric precursors.

M1NA.



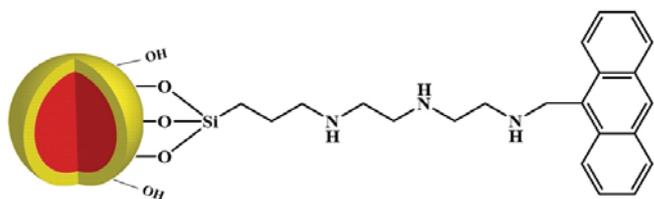
This system was prepared by reaction of 3×10^{-3} moles of 9-anthracene-1-carboxaldehyde and 3×10^{-3} moles of (3-aminopropyl)triethoxysilane in 150 cm^3 of dry ethanol. After one and a half hours, the yielded imine was reduced by addition of 794 mg of NaHB_4 under argon.

Finally, the hybrid inorganic–organic system was prepared by adding 1 g of boehmite-silica core–shell nanoparticles to an ethanolic solution of the functionalised anthracene-amine compound, keeping the samples under stirring for 3 h. The functionalised nanoparticles were collected by centrifugation, and the product was successively washed with CH_2Cl_2 , EtOH and an EtOH– H_2O mixture.

Elemental analysis: C 4.9%; N 0.3%.

Functionalisation yield: 2.3×10^{-4} moles of attached polyamines per gram of material.

M3NA.



Following the same synthetic procedure, the modified fluorescent

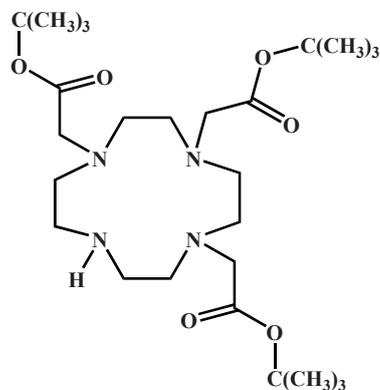
sensor M3NA was prepared with (N'-[3-(trimethoxysilyl)propyl]-diethylenetriamine, a triamine complexing unit.

Elemental analysis: C 4.4%; N 0.7%; H 2.8%.

Functionalisation yield: 1.7×10^{-4} moles of attached polyamines per gram of material.

5.2.3. Synthesis of contrast agents hybrid systems.

1,4,7-Tris(tert-butoxycarbonylmethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane.¹⁶



0.750 g (4.21 mmol) of 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane (cyclen) and 1.17 g of NaHCO_3 (13.90 mmol) were stirred in 25 mL of dry CH_3CN at 0°C . Then, 2.03 mL (13.90 mmol) of tert-butyl bromoacetate was added dropwise. The reaction was left to react for 30 hours. Protected cyclen was separated

by column chromatography (SiO_2 , CH_2Cl_2 :MeOH).

Yield: 46 %.

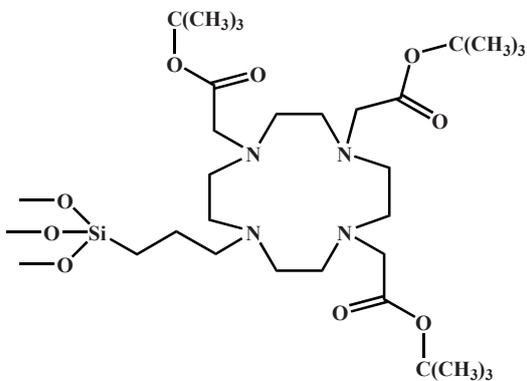
$\text{C}_{26}\text{H}_{50}\text{N}_4\text{O}_6$, MW: 514 g/mol.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm), 1.44 (s, 27H), 2.87 (s, 4H), 2.90 (s, 8H), 3.08 (s, 4H), 3.27 (s, 2H), 3.36 (s, 4H), 9.96 (s, 1H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ (ppm), 28.5, 47.8, 51.7, 58.5, 82.0, 170.0, 170.8.

m/z (CI) 515(MH^+).

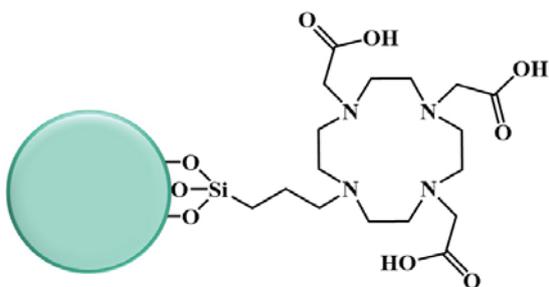
N-{3-[4,7,10-Tris(*tert*-butoxycarbonylmethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl]propyl}trimethoxysilane.



0.100 g (0.94553 mmol) of protected cyclen and 0.26 g (1.94553 mmol) of K_2CO_3 were stirred in dry CH_3CN under reflux. 39.27 μL (0.94553 mmol)

of (3-iodopropyl)trimethoxysilane were added and the mixture refluxed for 48 hours. After 48h, the solution was cooled at room temperature and the solvent vacuum removed. The oil obtained is used for the next step without further purification.

B-DO3A hybrid system.



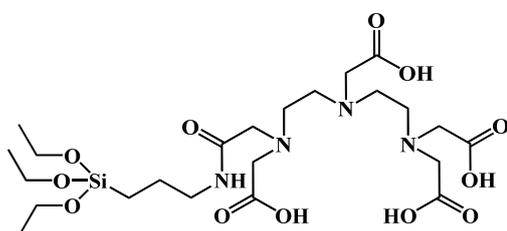
The oil obtained from the previous step was dissolved in toluene. To this solution was added 0.291 mmol of boehmite and the mixture refluxed for 24 hours. The solid was separated by centrifugation at 4000 rpm for 10 minutes and washed 4 times with EtOH. No unreacted (3-iodopropyl)trimethoxysilane or the hydrolyzed form was found in the nanoparticles as measured late by EDX.

In order to remove the protection groups, the solid obtained was stirred for 3-4 hours in a mixture of CH_2Cl_2 :TFA (trifluoroacetic acid)

(3:1). The acid was eliminated by washing and centrifuging the solid with CH_2Cl_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$ and finally with EtOH .

Elemental analysis: C 6.7%; N 1.3%; H 3.3%.

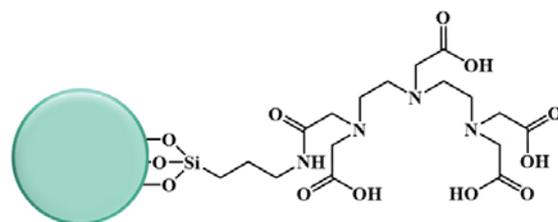
11,14,17-tetra(carboxymethyl)-8,11,14,17-tetraazadecan-8-oate-1-yl]propyl}triethoxysilane.¹⁷



0.72 g (2 mmol) of DTPA-bis(anhydride) was stirred on 30 mL of dry DMF containing 277 μL . of dry Et_3N . The mixture was stirred for

30 min and 2.2 eq. of (3-aminopropyl)-triethoxysilane were added to the solution. After 48 h, the solvent was evaporated and the crude mixture was solubilized in 50 mL of 0.5 M NaOH in water (50 mL). The basic solution was washed twice with 25 mL of CH_2Cl_2 , and evaporated again to give a white powder.

B-DTPA hybrid system.



The powder obtained in the previous step was solubilised in MeOH . The solution was heated at 60 $^\circ\text{C}$ and 0.6 g of boehmite

was added to the solution. The mixture was stirred for 1 day. The solvent was removed and the solid was washed 4 times with DMF and EtOH .

Elemental analysis: C 7.2%; N 1.2%; H 2.9%.

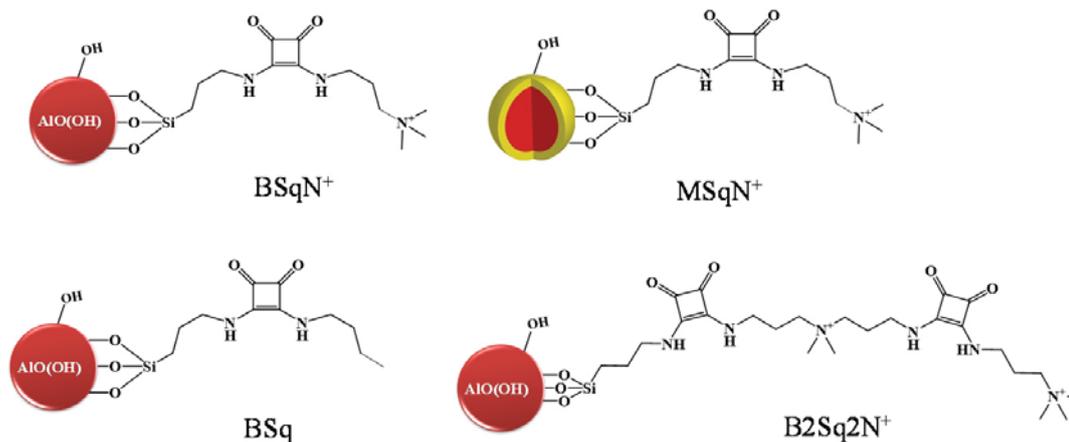
Lanthanide complexes.

The hybrid systems D-DO3A and B-DTPA were dispersed in 25 mL of CH₃CN and an equimolar quantity of lanthanide chloride was added.

Elemental analysis provided a loading of 2.8×10^{-4} , 2.2×10^{-4} and 1.6×10^{-4} moles of gadolinium, terbium and europium per gram of sample of B-DO3A; and 1.9×10^{-4} , 1.9×10^{-4} and 2.9×10^{-4} moles per gram of B-DTPA complexes of gadolinium, terbium and europium, respectively.

5.2.4. Synthesis of squaramide hybrid systems.

BSqN⁺, MSqN⁺, BSq, B2Sq2N⁺ hybrid systems.



The squaramide moieties were synthesised in the group of A. Costa in the Supramolecular Chemistry Group at University of Balearic Islands.¹⁸ The organic precursors were prepared by condensation of 3-(triethoxysilyl)propan-1-amine with the appropriated charged squaramide-ester.

Squaramide compounds (0.5 mmol) were dissolved in the minimum quantity of water and added dropwise to an ethanolic suspension of boehmite nanoparticles (1 g) placed in a round bottom flask. After 1 day stirring at room temperature, the obtained solids were separated by centrifugation. Then, the solids were repeatedly washed and centrifugated with ethanol, and a mixture of ethanol:water (60:30).

BSqN⁺:

Elemental analysis: C 9.7%; N 2.1%; H 2.7%.

Functionalisation yield: 5.04×10^{-4} moles of attached squaramide molecules per gram of material.

MSqN⁺:

Elemental analysis: C 3.1%; N 0.7%; H 1.3%.

Functionalisation's yield: 1.60×10^{-4} moles of attached squaramide molecules per gram of material.

BSq:

Elemental analysis: C 13.1%; N 2.2%; H 2.2%.

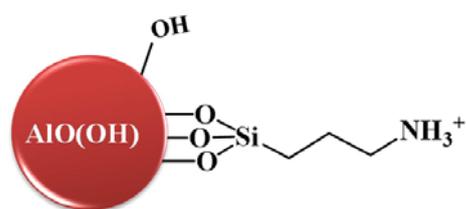
Functionalisation yield: 7.82×10^{-4} moles of attached squaramide molecules per gram of material.

B2Sq2N⁺:

Elemental analysis: C 11.4%; N 2.8%; H 2.1%.

Functionalisation yield: 3.41×10^{-4} moles of attached squaramide molecules per gram of material.

BNH₃⁺ hybrid system:



BNH₂ was prepared by reaction of 1 of boehmite nanoparticles with 3×10^{-3} moles of (3-aminopropyl)triethoxysilane in

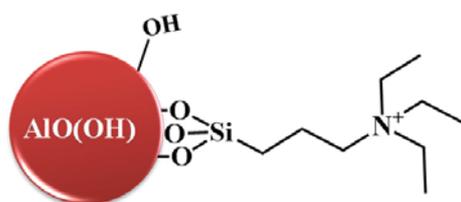
150 cm^{-3} of dry ethanol. The reaction was kept under stirring for 1 day at 60 °C. Finally, the functionalised nanoparticles were collected by centrifugation, and the product was successively washed with CH₂Cl₂, MeOH, and a MeOH/H₂O mixture.

The positive charge located on the primary amine was achieved during the experimental titrations in the acetic-acetate buffer.

Elemental analysis: C 26.2%; N 5.4%; H 7.8%.

Functionalisation yield: 3.84×10^{-3} moles of attached polyamines per gram of material.

BN⁺ hybrid system.¹⁹



The hybrid inorganic–organic system was prepared following the same procedure than for BNH₃⁺.

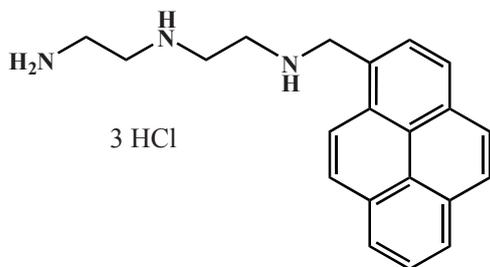
The BNH₂ nanoparticles were resuspended in EtOH (50 mL) to carry out the quarterisation of the primary amine. CH₃CH₂I (200 μL) were added to the ethanolic solution containing the modified nanoparticles under Ar and the mixture was heated at 90 °C with vigorous stirring overnight. Water (10 mL) was added and the mixture was refluxed for 3 h. Then the nanoparticles were collected by centrifugation, and the product was successively washed with CH₂Cl₂, EtOH and an EtOH–H₂O mixture.

Elemental analysis: C 13.0%; N 1.7%; H 7.6%.

Functionalisation yield: 1×10^{-4} moles of attached polyamines per gram of material.

5.2.5. Synthesis of pyrene hybrid systems.

N¹-(2-aminoethyl)-N²-(pyren-1-ylmethyl)ethane-1,2-diamine trihydrochloride salt.



3Npi was prepared by reaction of 1-pyrenecarboxaldehyde (5×10^{-3} mol) and diethylenetriamine (5×10^{-3} mol) in dry EtOH. The resulting mixture was stirred for 2 h at room

temperature, and then, a 4-fold excess of sodium borohydride was added. The reaction was kept for a further hour under stirring. The compound was isolated and characterized as its HCl salts.

C₂₁H₂₂Cl₃N₃, MW: 422.5 g/mol

Yield: 73 %

Melting point: 121.3 °C

Elemental analysis:

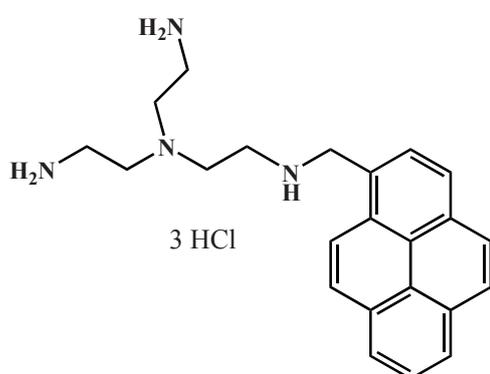
Calculated: C, 59.64; H, 5.21; N, 9.94

Experimental: C, 59.0; H, 5.0; N, 9.4

¹H NMR (300 MHz, D₂O): δ (ppm), 8.19 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 8.15 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 8.02 (t, J = 7.9 Hz, 2H), 7.99 – 7.93 (m, 2H), 7.91 – 7.83 (m, 2H), 7.77 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 4.72 (s, 4H), 3.45 (t, J = 6.9 Hz, 2H), 3.37 – 3.31 (m, 2H), 3.30 – 3.21 (m, 4H).

^{13}C NMR (75 MHz, D₂O): δ (ppm), 131.95, 130.64, 129.93, 128.91, 128.69, 128.66, 128.42, 127.11, 126.67, 126.09, 125.93, 124.88, 123.66, 123.28, 122.40, 121.31, 48.73, 44.56, 43.51, 42.86, 35.45.

N¹,N¹-bis(2-aminoethyl)-N²-(pyren-1-ylmethyl)ethane-1,2-diamine trihydrochloride salt.



Tpi was synthesized by the reaction of 1-pyrenecarboxaldehyde (8.7×10^{-3} mol) with a 4-fold excess of tris(2-aminoethyl)amine (tren) (3.5×10^{-2} mol) in dry EtOH. The resulting mixture was stirred for 2 h at

room temperature under argon, and then a 4-fold excess of sodium borohydride (3.5×10^{-2} mol) was added portionwise. After 2 h, the solvent was evaporated to dryness. The residue was treated with water and repeatedly extracted with CH_2Cl_2 (3×40 mL). The organic phase was dried with anhydrous MgSO_4 and the solvent evaporated to dryness to give an oil. The oil was then taken in a minimum amount of EtOH and precipitated with HCl in dioxane to obtain its hydrochloride salt.

$\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{Cl}_3\text{N}_4$, MW:468.16 g/mol

Yield: 78 %

Melting point: 121.3 °C

Elemental analysis:

Calculated: C 58.79%; N 11.92%; H 6.64%.

Experimental: C 58.6%; N 11.5%; H 6.8%.

^1H NMR (300 MHz, D_2O): δ (ppm), 8.26 (d, $J = 7.39$ Hz, 1H), 8.20 (d, $J = 6.95$ Hz, 1H), 8.09 (t, $J = 7.67$ Hz, 1H), 8.06 (d, $J = 9.06$ Hz, 1H), 8.02 (d, $J = 7.83$ Hz, 1H), 7.99 (d, $J = 7.88$ Hz, 1H), 7.95 (d, $J = 9.10$ Hz, 1H), 7.91 (d, $J = 9.36$ Hz, 1H), 7.82 (d, $J = 7.97$ Hz, 1H), 4.74 (s, 2H), 3.25 (t, $J = 6.77$ Hz, 2H), 3.05 (t, $J = 6.62$, 4H), 2.86 (t, $J = 6.92$ Hz, 2H), 2.81 (t, $J = 6.59$ Hz, 4H).

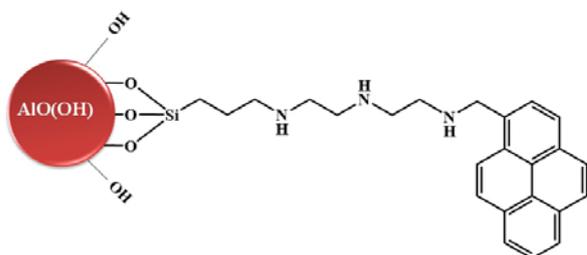
^{13}C NMR (75 MHz, D_2O): δ (ppm), 132.10, 130.95, 130.21, 129.23, 129.05, 128.90, 128.63, 127.43, 126.95, 126.36, 126.20, 125.13, 123.88, 123.57, 123.02, 121.66, 50.08, 48.82, 48.53, 44.03, 36.68.

ESI-MS (m/z):

Calculated for $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{N}_4$, 360.23.

Found: 361.23 [L + H] $^+$.

B3Npi hybrid system.



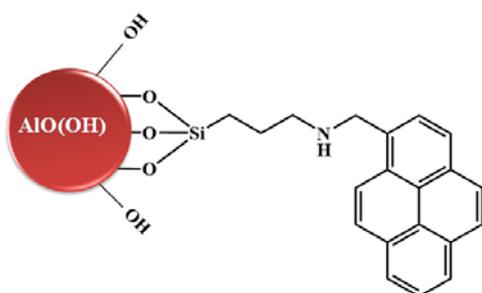
B3Npi was prepared by reaction of 1-pyrenecarboxaldehyde (3×10^{-3} mol) and N'-[3-(trimethoxysilyl)-propyl]-

diethylentriamine (3×10^{-3} mol) in methanol (150 mL). After 2 h of stirring at room temperature, a 4-fold excess of sodium borohydride was added.

Finally, the hybrid inorganic-organic system was prepared by adding 1 g of boehmite nanoparticles to a solution of the functionalised pyrene-amine compound, keeping the stirring for 3 h. The functionalised nanoparticles were collected by centrifugation, and the product was successively washed with CH_2Cl_2 , MeOH, and a MeOH- H_2O mixture.

Elemental analysis: C 3.3%; N 0.5%. H 2.8%.

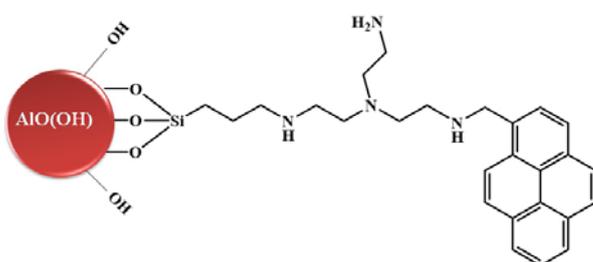
B1Npi hybrid system.



B1Npi was synthesised following the same procedure but in this case the reagent was (3-aminopropyl)-triethoxysilane.

Elemental analysis: C 1.5%; N 0.3%; H 1.9%.

BTpi hybrid system.



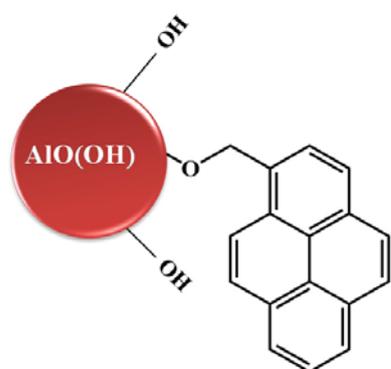
BTpi was synthesized by reaction of Tpy (5×10^{-3} mol) solved in dry EtOH (125 mL) with (3-iodopropyl)-trimethoxysilane (5×10^{-3} mol)

in an inert atmosphere for 24 h under stirring. Then, 1 g of boehmite nanoparticles was added to a solution of the functionalised pyrene-amine compound, keeping the stirring for 3 h. The functionalised nanoparticles

were collected by centrifugation, and the product was successively washed with toluene-EtOH, EtOH, EtOH-H₂O mixture, and EtOH. In each washing step, the solid was collected by centrifugation.

Elemental analysis: C 10.8%; N 2.8%; H 2.9%.

Bpi hybrid system.



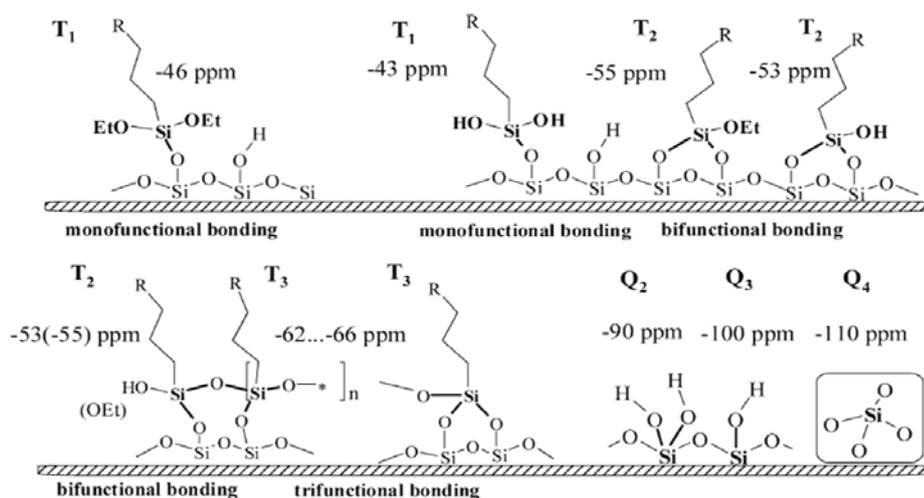
Bpi was prepared by reduction of 1-pyrenecarboxaldehyde (4.5×10^{-3} mol) with a 4-fold excess of sodium borohydride at room temperature. After that, the product was extracted with water and the resulting alcohol was reacted with the boehmite nanoparticles

by OH condensation. Finally, the solid was repeatedly washed with ethanol, dichloromethane, and ether. In each washing step, it was collected by centrifugation.

Elemental analysis: C 1.0%; H 2.7%.

5.2.6. General characterization for hybrid systems.

• ²⁹Si Nuclear magnetic resonance. It is well known that ²⁹Si NMR spectroscopy, which is sensitive to the first and second nearest neighbours, allows for an easy discrimination between the T (C–SiO₃) and the Q (SiO₄) units. The cleavage of the Si–C bonds of the T units to give the Q units produces an upfield shift of the ²⁹Si signal which moves from $\delta = -40$ to -80 ppm (T units) to $\delta = -90$ to -110 ppm (Q units). In this respect, the CP MAS ²⁹Si NMR is conclusive about the nature of the bond between the boehmite and the functionalised precursor.



Scheme 5.1. Chemical shifts for T and Q units in ²⁹Si NMR.

The substitution of silicon atoms by aluminium ones yields downfield shifts from 5 to 7 ppm of the ²⁹Si signals for every substituted silicon (scheme 5.1). In figure 5.12 are shown the ²⁹Si NMR of different synthesised hybrid systems during this PhD. The signals centred at -68.0 and -90 ppm, which are in agreement with a T₂ (CH₂–Si–(OAl)₂OH) and

T₃ (CH₂-Si-(OAl)₃) units demonstrating the covalent attachment of the silicon derivative to the boehmite surface through Si-O-Al bonds.²⁰

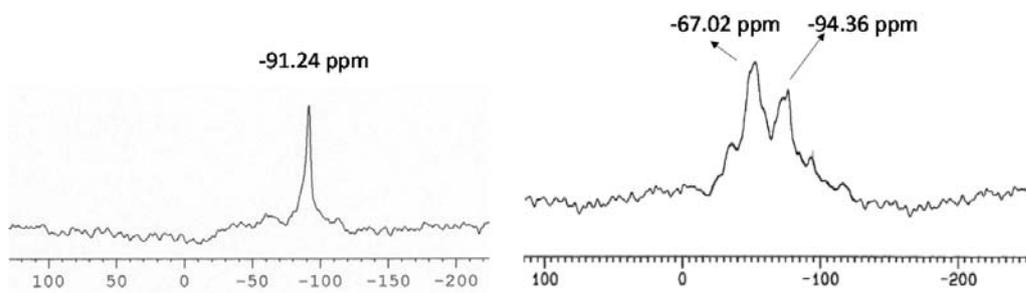


Figure 5.13. Examples of ²⁹Si NMR of functionalised nanoparticles.

- *Powder X-ray diffraction, infrared spectra, transmission electron microscopy and ²⁷Al nuclear magnetic resonance (in case of core-shell nanoparticles) were carried out for all the hybrid systems showing that the matrix of the supports have not been disrupted throughout the functionalization procedures.*

5.3. References.

-
- [1] B. E. Yoldas, *Amer. Ceram. Soc. Bull.*, 1975, 54, 289.
- [2] M. C. Roco, *J. Nanopart. Res.*, 1999, 1, 1.
- [3] W. J. Dalzell, D. E. Clark, *Ceram. Eng. Sci. Proc.*, 1986, 7, 1014.
- [4] R. Aucejo, J. Alarcón, C. Soriano, M. C. Guillem, E. García-España, F. J. Torres, *J. Mater. Chem.*, 2005, 15, 2920.
- [5] R. Petrovic, S. Milonjic, V. Jokanovic, L. J. Kostic-Gvozdenovic, I. Petrovic-Prelevic, Dj. Janackovic, *Powder Technol.*, 2003, 133, 185.
- [6] X. Bokhimi, J. A. Toledo-Antonio, M. L. Guzmán-Castillo, B. Mar-Mar, F. Hernández-Beltrán, J. Navarrete, *J. Solid State Chem.*, 2001, 161, 319.
- [7] M. Nguefack, A. F. Popa, S. Rossignol, C. Kappenstein, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2003, 5, 4279 .
- [8] a) T. Tsukada, H. Segawa, A. Yasumori, K. Okada, *J. Mater. Chem.*, 1999, 9, 549. b) X. Bokhimi, J. A. Toledo-Antonio, M. L. Guzman-Castillo, B. Mar-Mar, F. Hernandez-Beltran, J. Navarrete, *J. Solid State Chem.*, 2001, 161, 319.
- [9] J. A. Wang, X. Bokhimi, A. Morales, O. Novaro, T. Lopez, R. Gomez, *J. Phys. Chem. B.*, 1999, 103, 299.
- [10] a) I. A. Aksay, D. M. Dabbs, M. Sarikaya, *J. Am. Ceram. Soc.*, 1991, 74, 2343. b) J. L. Andrews, G. H. Beall, A. Lempicki, *J. Lumin.*, 1986, 36, 65. c) Y. Iqbal, W. E. Lee, *J. Am. Ceram. Soc.*, 2000, 83, 3121.
- [11] a) I. A. Aksay, J. A. Pask, *J. Am. Ceram. Soc.*, 1975, 58, 507. b) F. J. Klug, S. Prochazka, R. H. Doremus, *J. Am. Ceram. Soc.*, 1987, 70, 750.
- [12] E. R. de Sola, F. Estevan, F. J. Torres, J. Alarcón, *J. Non-Crystalline Solids*, 2005, 351, 1202.

- [13] a) R. S. Mc Donald, *J. Phys. Chem.*, 1958, 62, 1168., b) S. Musić, N. Filipović-Vinceković, L. Sekovanić, *Braz. J. Chem. Eng.* 2011, 28, 89.
- [14] a) M. Sales, J Alarcón, *J. Eur. Ceram. Soc.*, 1996, 16, 781. b) K. Okada, N. Otsuka, *J. Am. Ceram. Soc.*, 1986, 69, 652.
- [15] Y. Hirata, K. Sakeda, Y. Matsushita, K. Shimada, Y. Ishihara *J. Am. Ceram. Soc.*, 1989, 72, 995.
- [16] A. Dadabhoy, S. Faulkner, P. G. Sammes, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 2002, 348.
- [17] M. Querol, J. W. Chen, R. Weissleder, A. Bogdanov Jr., *Org. Lett.*, 2005, 7, 1719.
- [18] M. N. Piña, C. Rotger, B. Soberats, P. Ballester, P. M. Deyà, A. Costa, *Chem. Commun.*, 2007, 963.
- [19] J. F. W. Keana, Y. Wu, G. Wu, *J. Org. Chem.*, 1987, 52, 2571.
- [20] a) J. Jiao, S. Altwasser, W. Wang, J. Weitkamp, M. Hunger, *J. Phys. Chem. B*, 2004, 108, 14305, b) S. Ek, E. I. Iiskola, L. Niinistö, J. Vaittinen, T. T. Pakkanen, A. Root, *J. Phys. Chem. B*, 2004, 108, 11454.

6.

**Nanopartículas de bohemita
modificadas para la detección
de Hg(II) en agua.**



6.1. Introducción.

El mercurio existe principalmente en tres estados de oxidación: Hg(0) (metálico), Hg(I) (mercurioso) y Hg(II) (mercúrico). El mercurio es uno de los componentes más tóxicos que se puede encontrar en la naturaleza, ya que incluso a concentraciones muy bajas puede causar enfermedades digestivas, que afecten al buen funcionamiento del riñón, e incluso neurológicas.¹ La agencia de protección medioambiental (EPA)² indica el nivel máximo de Hg(II) permitido en el agua de consumo en 2 ppb. Sin embargo, hoy en día la contaminación medioambiental por mercurio es un gran problema debido a la existencia de una gran variedad de fuentes de mercurio, desde naturales (por ejemplo, la actividad volcánica) hasta industriales (la explotación de minas, los combustibles fósiles, etc) (figura 6.1). El ciclo global del mercurio engloba la emisión de Hg(0) desde la tierra y las aguas superficiales a la atmósfera, donde se puede transformar en otras especies solubles y volver mediante diferentes procesos de deposición. En este sentido, España es uno de los países con una mayor exportación de mercurio dentro de la Unión Europea, debido en gran medida a las minas de Almadén, que producen más de 1000 toneladas al año (si bien es cierto, que la cantidad de mercurio que se libera al medioambiente es desconocida). Si además se tiene en cuenta que la cantidad de mercurio derivada de actividades humanas ronda entre 2000 y 3000 toneladas al año, es necesario prestar atención al flujo de mercurio que va al medioambiente y su efecto en él.³

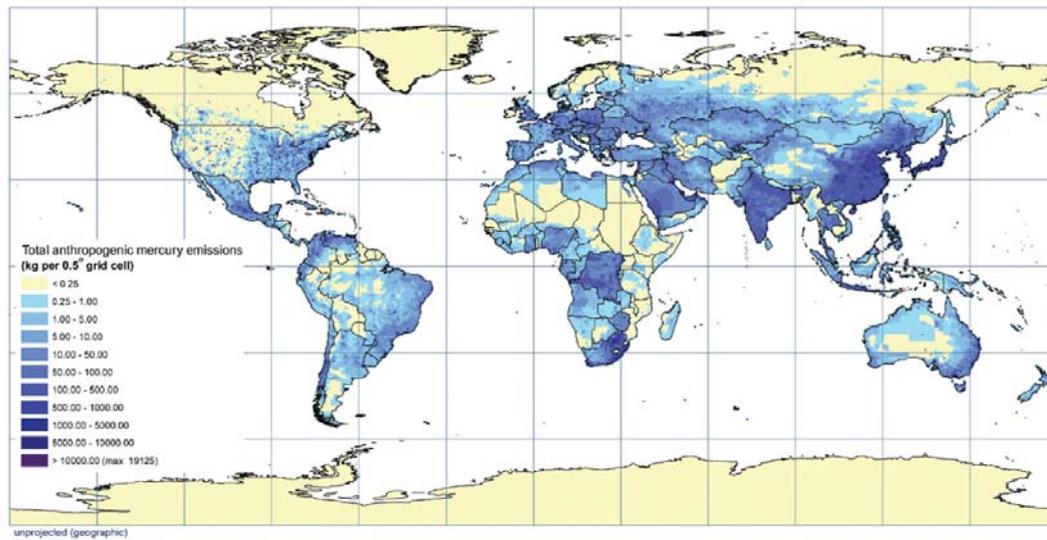


Figura 6.1. Distribución espacial de las emisiones de mercurio antropogénico a la atmósfera en el año 2000.⁴

El problema y/o el peligro de los procesos de deposición de mercurio en la tierra se deben a que el mercurio inorgánico se oxida a Hg(II) y se transforma en compuestos organomercuriales (figura 6.2). Por ejemplo, el metilmercurio es conocido por acumularse en los peces y mamíferos marinos, alcanzando niveles máximos en las especies depredadoras que se encuentran al final de la cadena alimenticia entrando, de esta forma, en la dieta del ser humano. Por eso, el desarrollo de métodos eficaces para la detección de mercurio catiónico en disoluciones acuosas con un alto grado de sensibilidad y selectividad es muy importante.

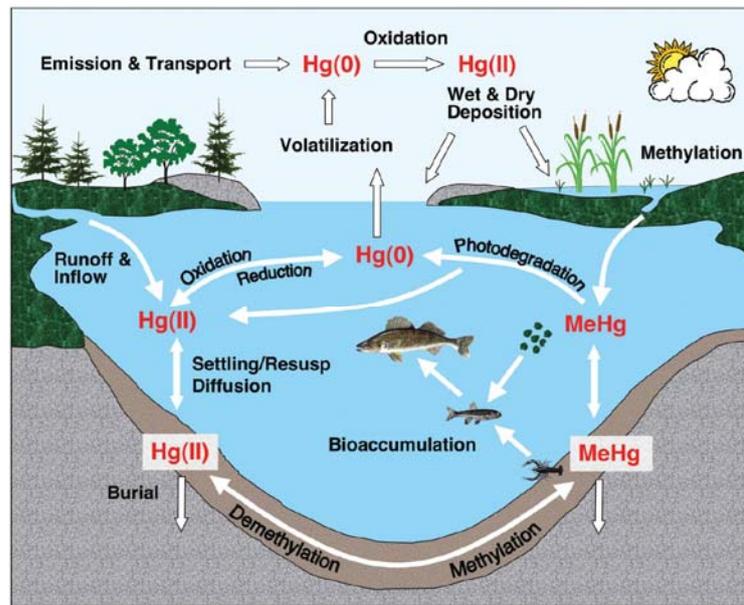


Figura 6.2. Ciclo del mercurio en un lago donde se puede producir metilmercurio tóxico.⁵ Abreviaturas: Hg(0), mercurio en su forma elemental; Hg(II), mercurio divalente; MeHg, metilmercurio.

Hoy en día existen diferentes tipos de sensores químicos y físicos desarrollados para la detección de Hg(II) que usan una gran variedad de métodos experimentales y técnicas diferentes como la absorción atómica, la electroquímica, la espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente, la espectroscopía de resonancia magnética, etc.^{6,7,8,9,10,11,12,13} Aunque estas técnicas han dado resultados analíticos muy buenos, tienen como desventaja el uso de equipamiento costoso y tiempos de preparación de muestras y medida largos. Desde nuestro punto de vista, los sensores ópticos representan una de las posibilidades más interesantes para resolver los inconvenientes antes mencionados debido a que son técnicas que no requieren una instrumentación cara, la toma de resultados es rápida y en la mayoría de los casos no es necesario un pretratamiento de las muestras.¹⁴ Además, es necesario realizar un esfuerzo extra en el desarrollo de quimiosensores que sean capaces de detectar mercurio en

agua, sin la necesidad de utilizar medios orgánicos (o mezclas de disolventes orgánicos y acuosos), de manera que las medidas, y por tanto los resultados se puedan llevar a cabo en muestras “reales”, que en su mayoría se encuentran en medios acuosos.

6.2. Poliaminas como quimiosensores metálicos.

Como se ha discutido en la introducción general, a la hora de diseñar un quimiosensor luminiscente se deben tener en cuenta tanto las características del receptor como las de la unidad indicadora. Si nos centramos en el reconocimiento de iones metálicos, la estabilidad del complejo catión-ligando depende de muchos factores: naturaleza del catión y del disolvente, la temperatura, la fuerza iónica, etc. Es por ello que las características del receptor (su topología, el número y el tipo de grupos funcionales) se deben adecuar a las del sustrato (diámetro iónico, densidad de carga, número de coordinación).

En el diseño de nuestro quimiosensor híbrido se ha decidido utilizar poliaminas de cadena abierta (acíclicas) por las grandes ventajas que presentan. Los compuestos poliamínicos se caracterizan por ser solubles en agua y ser receptores ambivalentes, capaces de coordinar metales (cuando el número de grupos amino no protonados es suficiente) y especies aniónicas (cuando los grupos amino se encuentran protonados). Además, si se añade una unidad fluorescente a la cadena poliamínica, se introducen las ventajas de la espectroscopía de fluorescencia como técnica de detección barata, fácil y rápida. Una ventaja adicional que presenta el uso de poliaminas en disolventes próticos, es el hecho de que los protones compiten con los iones metálicos por los grupos amino. En fase gas, la

afinidad que presentan los grupos amino por los protones sigue la tendencia: grupo amino terciario > secundario > primario. Sin embargo, en disolución acuosa la tendencia es secundario \approx primario > terciario ya que las moléculas de agua pueden formar enlaces por puentes de hidrógeno fácilmente con las aminas protonadas y solvatarlas. Así, cuanto menor es la sustitución del grupo amino, mayor es la solvatación y por tanto la estabilidad de la especie.¹⁵

Dado que el grupo amino tiene propiedades electrón dadoras, puede intervenir en procesos de transferencia electrónica cuando un fluoróforo se encuentra próximo. La protonación de los grupos amino previene estos procesos, por lo que la fluorescencia de estos sistemas puede ser modulada a través de los procesos de protonación y desprotonación de los grupos amino.

Además, dado que la síntesis de este tipo de ligandos es relativamente sencilla y barata, se pueden realizar modificaciones en la estructura de cara a la obtención de un quimiosensor lo más sensible y selectivo posible, sin que ello suponga un gran esfuerzo sintético o económico. En este sentido, se ha decidido variar el número de átomos de nitrógeno de la cadena poliamínica para estudiar su efecto en el reconocimiento de los sustratos y en la solubilidad del propio sistema híbrido.

Por todo ello, y debido a las características que presenta el Hg(II) como el efecto de metal pesado y su tendencia a formar complejos de bajo número de coordinación, se ha desarrollado un material híbrido compuesto por nanopartículas funcionalizadas con poliaminas acíclicas, en las que mediante el empleo de la espectroscopía de fluorescencia, se pretende

detectar este catión mediante la desactivación de la emisión de fluorescencia.

6.3. Sistemas híbridos empleados.

La nanotecnología es un área multidisciplinar cuyo desarrollo es útil en diferentes campos de la ciencia y la tecnología. La síntesis, propiedades y aplicaciones que se le pueden dar a estos materiales es muy diversa y se extiende desde el campo de la biomedicina, con el desarrollo de agentes de imagen, liberación de fármacos, herramientas de diagnóstico, pasando por el campo del medioambiente para la detección de contaminantes, hasta el campo de la electrónica con el desarrollo de materiales con aplicaciones ópticas.¹⁶ Dentro de los diferentes tipos de sistemas que pueden emplearse en el desarrollo de quimiosensores híbridos, cabe destacar el empleo de nanopartículas con arquitectura de núcleo-envoltura. Este tipo de materiales consiste en un núcleo interno de una composición química determinada y una capa externa de otra diferente. Esta característica estructural abre la posibilidad de combinar diferentes materiales y por lo tanto diferentes propiedades en una misma entidad.



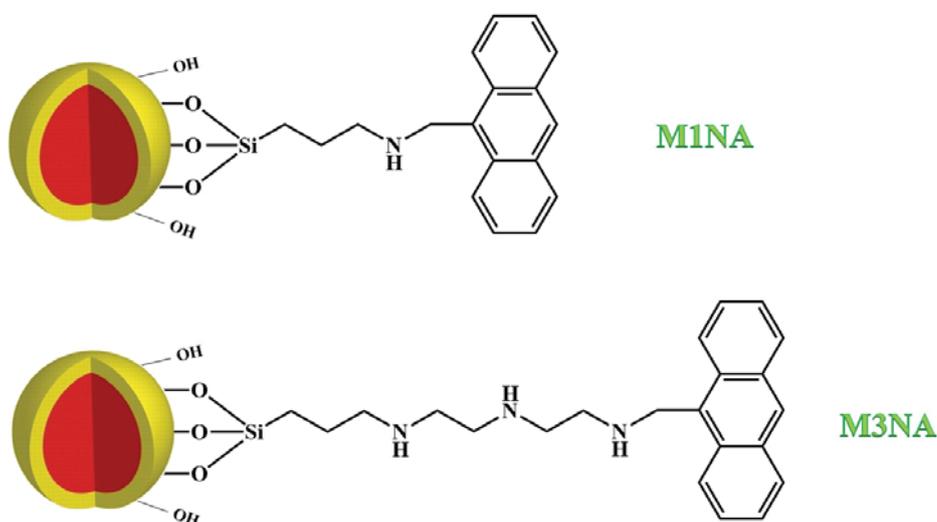
Esquema 6.1. Composición de las nanopartículas con arquitectura núcleo-envoltura.

En nuestro caso se ha decidido trabajar con nanopartículas en las que el núcleo está compuesto por bohemita cristalina rodeada de una fina capa de sílice amorfa, por las ventajas que estos dos materiales proporcionan (esquema 6.1).

- El empleo de una estructura cristalina como núcleo hace que el grado de homogeneidad de las nanopartículas finales sea elevado tanto en la forma como en el tamaño. Cuando se trabaja con nanopartículas de sílice amorfa de diámetros alrededor de 20 nm, es usual tener problemas de falta de homogeneidad y agregación de las nanopartículas ya que la síntesis se ve afectada por un gran número de factores como el procedimiento de mezcla de los reactivos, el secado de las nanopartículas.¹⁷
- La adición de una envoltura durante la síntesis del núcleo de las nanopartículas permite controlar el tamaño de las mismas. En este caso se han sintetizado nanopartículas con un diámetro medio de 10 nm, que son menores a las nanopartículas de bohemita cuyo tamaño alcanza en algunos casos los 20 nm de diámetro.
- La estabilidad de las disoluciones coloidales se mantiene en un amplio intervalo de pH. Las dispersiones de bohemita son, a concentraciones milimolares, estables hasta pH fisiológico, a partir del cual empiezan a coagular. Sin embargo, las nanopartículas de bohemita-sílica han resultado ser estables en disolución acuosa hasta pH 12 en el mismo rango de concentración.

A continuación se muestran los receptores híbridos que se van a estudiar en este capítulo (esquema 6.2). En los dos casos se ha empleado el mismo tipo de nanopartículas como soporte sólido (denominadas M) y se han utilizado dos cadenas poliamínicas abiertas que contienen una única

amina secundaria en un caso (1N) y 3 aminas secundarias en el otro (3N), incluyendo en ambos casos el fluoróforo antraceno (A) como unidad señalizadora. Los sistemas híbridos sintetizados se han denominado M1NA y M3NA respectivamente. Para conocer la cantidad de poliamina anclada a la superficie de las nanopartículas se ha realizado un calibrado mediante fluorescencia utilizando las moléculas libres (1NA y 3NA) además de los resultados obtenidos del análisis elemental.



Equema 6.2. Sistemas híbridos sintetizados.

Aunque la preparación de estos sistemas híbridos puede parecer simple, su diseño no ha sido trivial. Se ha tenido en cuenta la capacidad del mercurio por formar complejos con un índice de coordinación 2 de relativa estabilidad a la hora de elegir poliaminas acíclicas con un número pequeño de átomos dadores, a diferencia de lo que pasa con otros iones metálicos como el Cu(II) o el Zn(II) que presentan preferiblemente índices de coordinación más elevados (4,5 y 6).¹⁸

6.4. Estudios fluorimétricos.

El primer paso a la hora de estudiar un sistema mediante espectroscopía de fluorescencia es conocer su espectro de absorción y encontrar las condiciones de excitación y emisión óptimas en las condiciones experimentales de trabajo.¹⁹ En la figura 6.3 se muestra el espectro de absorción y emisión del sistema M3NA. El espectro de absorción muestra las 3 bandas características del antraceno centradas a 353 nm, 369 nm y 389 nm. Se ha representado el espectro de absorción junto con el espectro de emisión de fluorescencia para mostrar cómo, en el caso de algunas moléculas aromáticas, es posible distinguir las transiciones entre diferentes niveles vibracionales (ver sección de luminiscencia, apartado 1.2). Además, se observa que el espectro de fluorescencia es la imagen especular del espectro de absorción con un desplazamiento de Stokes mínimo, o lo que es lo mismo, una casi total coincidencia de las transiciones $\nu_0-\nu_0$ (E_{0-0}).

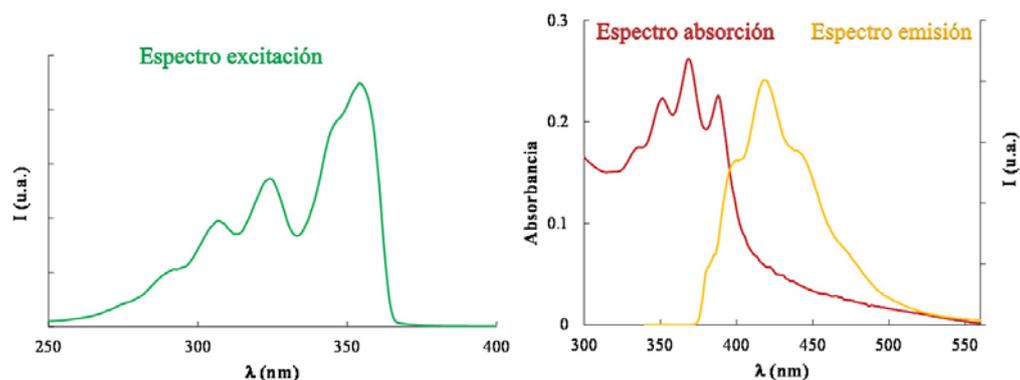


Figura 6.3. Espectro de excitación, absorción y emisión del sistema M3NA,

$$\lambda_{\text{exc.}} = 350 \text{ nm y } \lambda_{\text{emis.}} = 416 \text{ nm.}$$

6.4.1. Comportamiento ácido - base en disolución acuosa.

Como se ha comentado anteriormente, se ha demostrado que los ligandos poliamínicos son receptores muy versátiles ya que son capaces de coordinar especies catiónicas o aniónicas en función del grado de protonación de los grupos amino. Dado que las reacciones de complejación compiten con las de protonación, es necesario conocer previamente las propiedades ácido-base de los receptores polinitrogenados antes de estudiar la capacidad coordinativa de los ligandos.²⁰

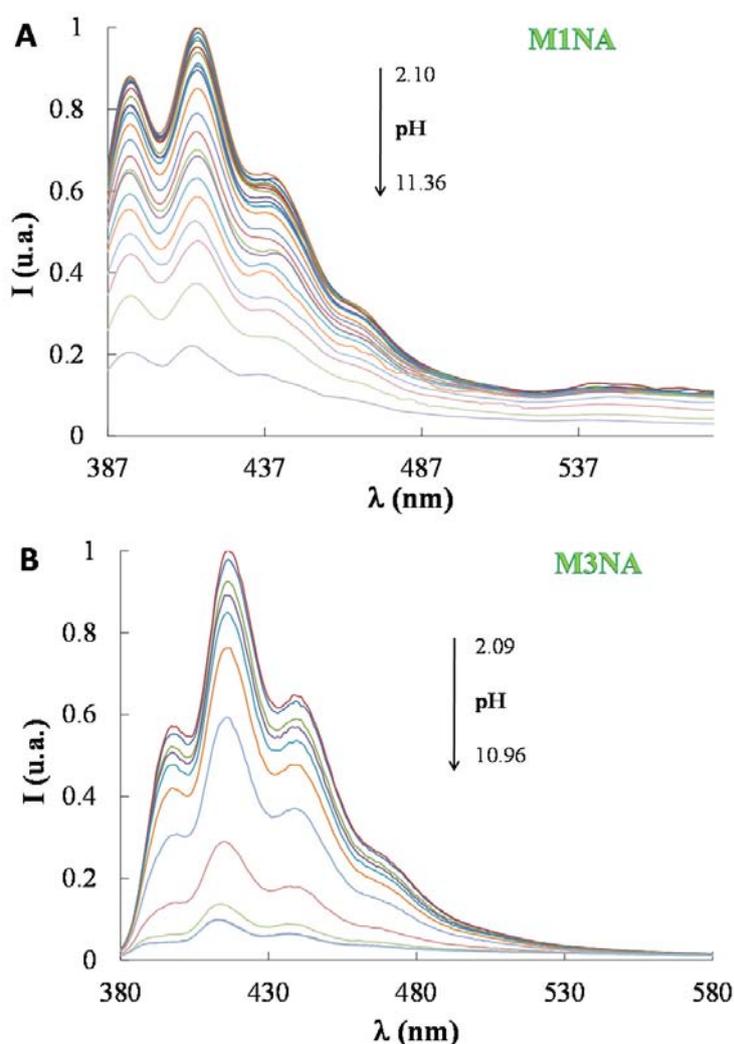


Figura 6.4. Variación de los espectros de emisión de fluorescencia de los sistemas M1NA (A) y M3NA (B) en función del pH. $\lambda_{exc.} = 350$ nm.

En general, el comportamiento luminiscente en receptores poliamínicos que contienen grupos fluoróforos depende en gran medida del grado de protonación de dichos receptores. Una valoración fluorimétrica ácido-base de los receptores permite conocer cómo varía la emisión en función del pH y, por lo tanto, seleccionar los intervalos de pH adecuados para realizar los estudios posteriores de coordinación. Las valoraciones de los receptores híbridos M1NA y M3NA muestran en ambos casos una disminución en la intensidad de emisión conforme se aumenta el pH (figura 6.4). Además, únicamente se observa la emisión debida al monómero del antraceno, sin observar formación de excímeros en ninguno de los dos sistemas. Para evaluar más fácilmente el efecto del cambio de pH sobre la emisión de fluorescencia de los diferentes sistemas, se ha representado la variación del máximo de emisión ($\lambda_{\text{emis.}} = 416 \text{ nm}$) en función del pH (figura 6.5).

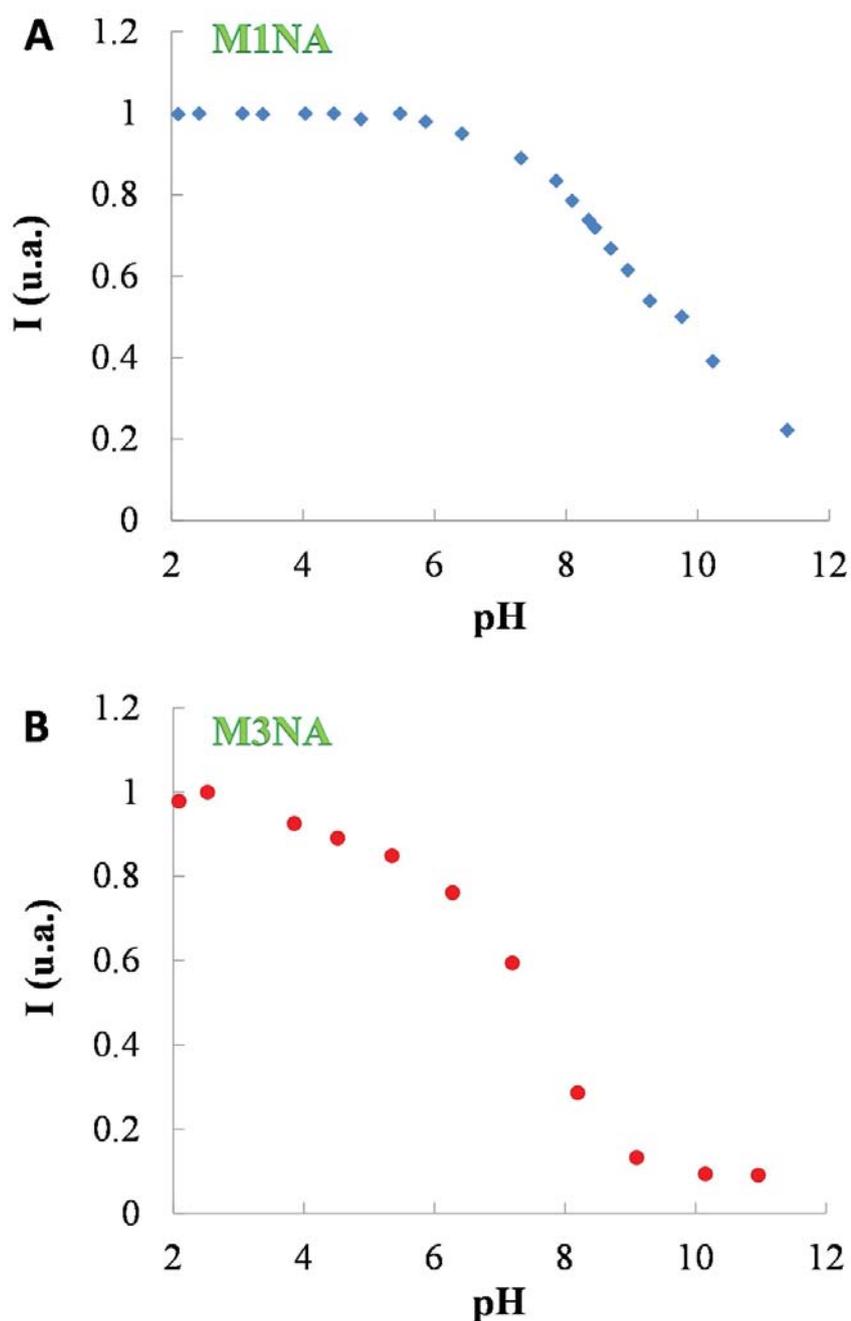


Figura 6.5. Variación del máximo de emisión de fluorescencia de los sistemas M1NA (A) y M3NA (B) en función del pH, $\lambda_{exc.} = 350$ nm y $\lambda_{emis.} = 416$ nm.

La desactivación de la emisión de la fluorescencia (*CHEQ*) que se produce al aumentar el pH, se puede explicar a través de un mecanismo de transferencia electrónica fotoinducida desde el par de electrones solitario

de la amina a un estado excitado del antraceno (figura 6.6). Cuando la amina se encuentra en su forma protonada, el par de electrones del nitrógeno se encuentra interaccionando con el protón, por lo que no hay desactivación de la emisión de fluorescencia del antraceno ya que la vuelta al estado fundamental se produce a través un proceso radiativo. Sin embargo, cuando los grupos amonio se desprotonan, se produce una transferencia electrónica desde la amina al fluoróforo forzando la desactivación no radiativa del estado excitado.

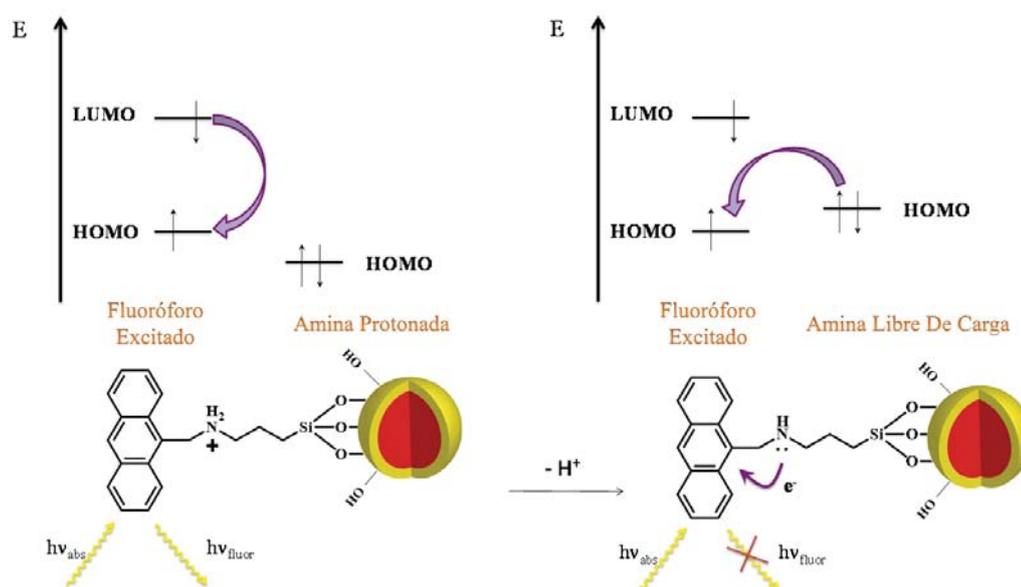


Figura 6.6. Mecanismo de transferencia electrónica fotoinducida producida por la desprotonación de la amina.

6.4.2. Química de coordinación catiónica.

El comportamiento fotoquímico de un ligando libre puede verse modificado al complejar cationes.²¹ Dependiendo de la naturaleza del ion metálico se pueden observar dos efectos diferentes. Existen algunos metales que producen una desactivación de la emisión de fluorescencia (efecto *CHEQ*), mientras que la complejación a otros iones metálicos tiene como consecuencia un aumento de la fluorescencia (efecto *CHEF*).

Por ejemplo, el Ca(II), el Zn(II) y en menor medida el Cd(II) son metales que suelen producir en la mayoría de los casos un efecto CHEF, mientras que el Cu(II), el Ni(II) y el Hg(II) suelen provocar un efecto CHEQ.²² A la hora de predecir el efecto que un determinado metal tendrá en la fluorescencia, es útil tener en cuenta las siguientes consideraciones:²³

- Los átomos pesados como el Hg(II) y el Pb(II) tienen constantes de acoplamiento spin-órbita (ζ) grandes. Se sabe que valores de ζ grandes estabilizan los estados triplete lo que se traduce en mayores tiempos de vida del estado excitado y por lo tanto, en una mayor tendencia a experimentar relajaciones no radiativas para volver al estado fundamental.
- Los metales paramagnéticos del bloque “d” como el Cu(II) o el Ni(II) de alto spin, al igual que los del bloque “f” como el Gd(III) o el Tm(III) son capaces de inhibir mucho la fluorescencia.
- Los metales como el Ca(II) y el Zn(II) tienen un peso atómico relativamente bajo y no son paramagnéticos. Son metales que presentan índices de coordinación altos, por lo que son capaces de bloquear los pares de electrones solitarios localizados en la molécula orgánica y, por lo tanto producir un efecto CHEF en la fluorescencia de la misma

- Por último, los cationes Ca(II) , Zn(II) y Ag(I) , con configuración electrónica d^{10} , suelen producir un aumento de la emisión de fluorescencia en ligandos de tipo poliamínico, ya que no suelen introducir estados excitados centrados en el metal o estados excitados con separación de carga, que conllevarían procesos de transferencia electrónica o transferencia de carga, ambos mecanismos de relajación no radiativos.

Una vez conocido el comportamiento fotoquímico de los sistemas híbridos en disolución acuosa en función del pH, se procedió a estudiar el efecto de una serie de metales sobre la emisión de fluorescencia. Se repitieron las valoraciones fluorimétricas de los sistemas híbridos después de adicionar cantidades equimoleculares de los diferentes metales. En la figura 6.7 se muestra la variación del espectro de emisión del sistema Cu(II):M3NA en relación molar 1:1 en función del pH.

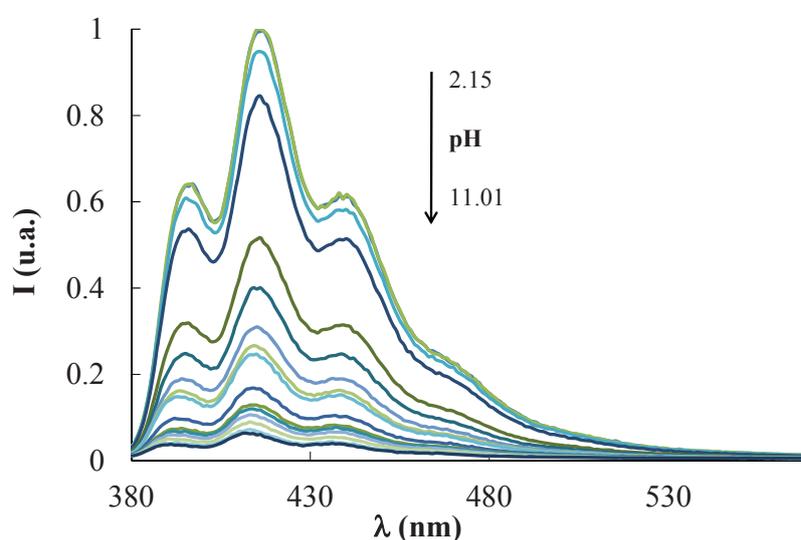


Figura 6.7. Emisión de fluorescencia del sistema Cu(II) : M3NA en función del pH, $\lambda_{\text{exc.}} = 350 \text{ nm}$.

Para poder comparar los cambios producidos por los diferentes metales se puede representar el máximo de emisión de fluorescencia frente al pH, y compararlo con la respuesta fotoquímica del sistema libre (figura 6.8).

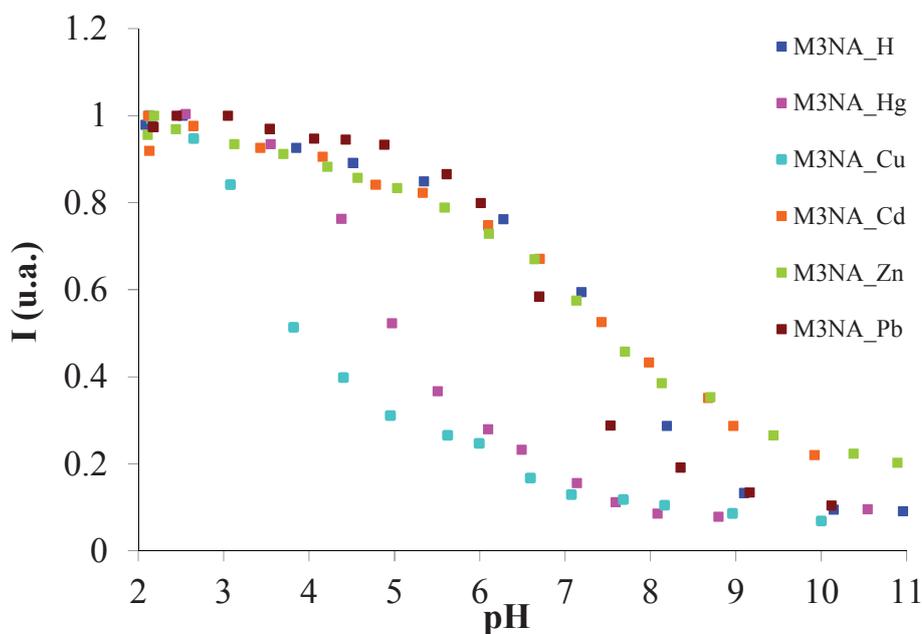


Figura 6.8. Variación del máximo de emisión de fluorescencia del sistema M3NA en función del pH con cantidades equimolares de diferentes metales.

$$\lambda_{\text{exc.}} = 350 \text{ nm y } \lambda_{\text{emis.}} = 416 \text{ nm.}$$

Mientras que el Zn(II), el Pb(II) y el Cd(II) no son capaces de alterar la emisión de fluorescencia del sistema M3NA, sí que se observa una disminución de la fluorescencia cuando se añade Cu(II) y Hg(II) a la disolución, observándose un efecto *CHEQ* en un amplio intervalo de pH. A partir de estos resultados se puede decir que el sistema híbrido M3NA es capaz de detectar Cu(II) y Hg(II) en una disolución acuosa a diferentes pHs. Además, esta detección es selectiva frente a otros metales ensayados en los que no se produce ninguna respuesta fotoquímica a la presencia del metal.

Se realizaron los mismos ensayos para el sistema M1NA (figura 6.9). Los cationes Cu(II) y Hg(II) muestran un efecto *CHEQ* mucho más llamativo que el observado para el sistema M3NA, siendo el Hg(II) el ion metálico que produce una mayor desactivación de la emisión de la fluorescencia desde pH ácido. Además, en el caso del Pb(II) se observa un efecto *CHEF* para esta relación molar entre pH 7 y 10.

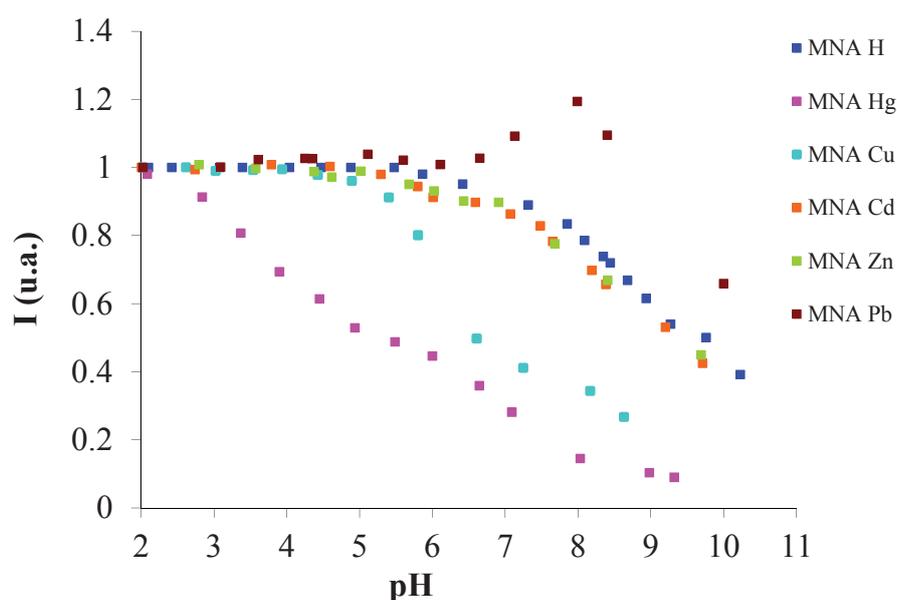


Figura 6.9. Variación del máximo de emisión de fluorescencia del sistema M1NA en función del pH con cantidades equimolares de diferentes metales, $\lambda_{exc.} = 350 \text{ nm}$ y $\lambda_{emis.} = 416 \text{ nm}$.

Uno de los objetivos de este capítulo de tesis ha sido la síntesis de sistemas híbridos capaces de detectar mercurio. Por ello, a partir de la respuesta luminiscente obtenida en función del pH se pueden seleccionar dos pH's donde la detección es más efectiva. En la gráfica 6.10 se representa el % de desactivación de la fluorescencia para el sistema M(II):M1NA y M(II):M3NA a pH 5 y pH 7.5 respectivamente.

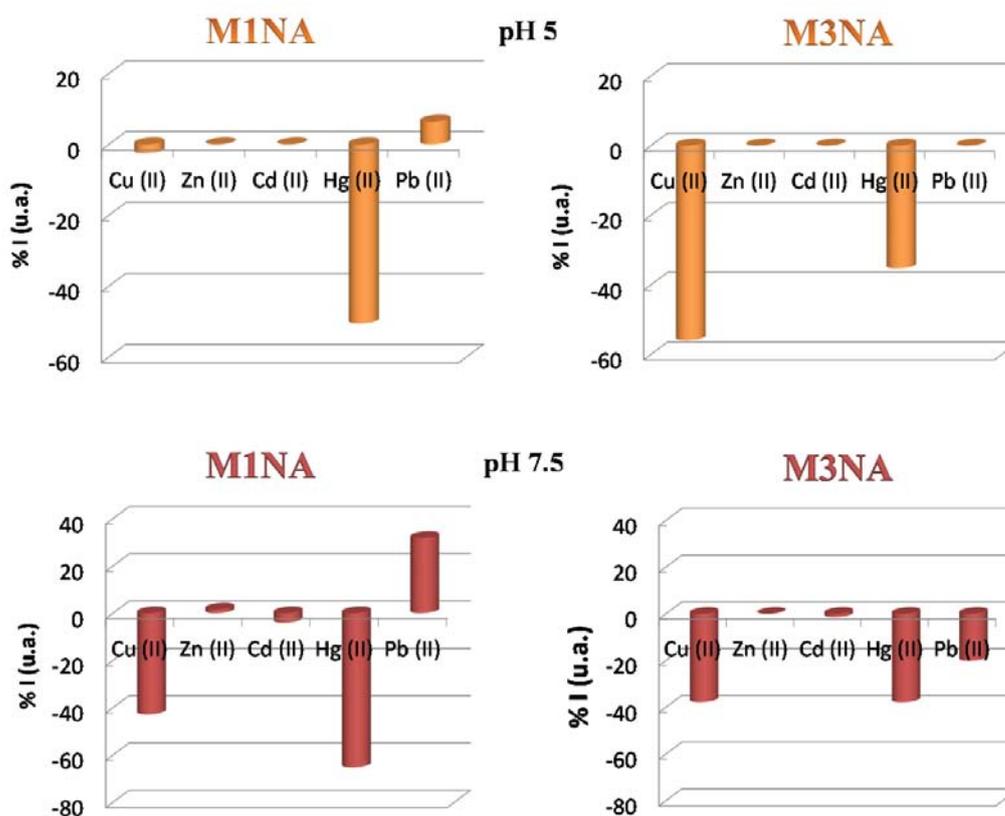


Figura 6.10. Representación de la respuesta en la emisión de fluorescencia de los sistemas M1NA y M3NA tras la adición de varios metales divalentes en relación equimolar a pH 5 y 7.5, $\lambda_{exc.} = 350$ nm y $\lambda_{emis.} = 416$ nm. (Los resultados se han referenciado considerando una respuesta del sistema libre igual a cero).

Es importante resaltar la capacidad del sistema M1NA para detectar Hg(II) a pH 5. Estos resultados se pueden explicar por la capacidad del mercurio de formar complejos estables con índices de coordinación bajos. Por ejemplo, el Cu(II) es capaz de formar un complejo con la metilamina con una constante de estabilidad de 4 unidades logarítmicas, mientras que el correspondiente complejo con mercurio se forma con una constante de 7 unidades logarítmicas.²⁴ Dado que la constante es más alta, el mercurio es capaz de desplazar a los protones localizados sobre los grupos amina antes que el cobre.

Cuando cambiamos al sistema híbrido M3NA, con tres aminas en su estructura, la tendencia se invierte a favor de la detección de cobre, ya que la efectividad de la desactivación de la fluorescencia es mayor en el caso del cobre que en el del mercurio. Sin embargo, la utilidad de este sistema híbrido para detectar mercurio en presencia de otros metales pesados es aún remarcable, ya que el resto de metales pesados como el Cd(II) y Pb(II) no provocan ningún efecto en la emisión de fluorescencia del sistema híbrido.

Otro aspecto a tener en cuenta cuando se realizan estudios de reconocimiento es la estequiometría del complejo formado. Cuando se trabaja con sistemas híbridos es difícil conocer la estequiometría con la misma exactitud que cuando se trabaja en disolución. Sin embargo, a partir de la respuesta fotoquímica y del grado de funcionalización se ha podido establecer que se trata de complejos 1:1 M(II):L. Sólo se podría pensar en la formación de complejos 1:2 (figura 6.11) si en las valoraciones se hubiera observado la aparición de la banda del excímero; la coordinación del metal a dos cadenas poliamínicas acercaría las unidades de antraceno lo suficiente para que se diera un apilamiento de las unidades aromáticas. El hecho de que no se haya formado un excímero para ninguno de los metales apoya la hipótesis de un complejo de estequiometría 1:1.

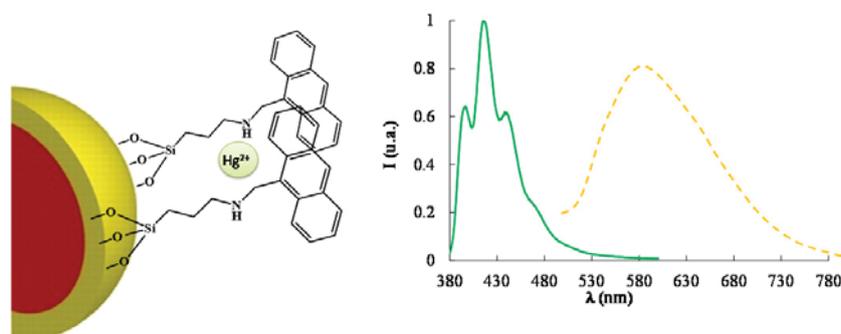


Figura 6.11. Representación de la funcionalización de la superficie de las nanopartículas que daría lugar a la formación de un excímero (naranja).

6.4.3. Cálculo del límite de detección.

Una vez que se ha alcanzado el objetivo de obtener un sistema híbrido capaz de reconocer mercurio en disolución acuosa, es importante determinar la sensibilidad del proceso de reconocimiento. El límite de detección (LD) se define como la cantidad mínima de sustrato necesaria para producir una respuesta diferenciable a la del blanco, que en nuestro caso sería el sistema híbrido en ausencia de mercurio (ver apartado 4.15).²⁵

En la figura 6.12, se representa la variación de la emisión de fluorescencia a 416 nm frente a la adición de cantidades crecientes de Hg(II) a pH 5. Como se ha comentado en el capítulo 4, es necesario conocer la pendiente para poder calcular el LD.

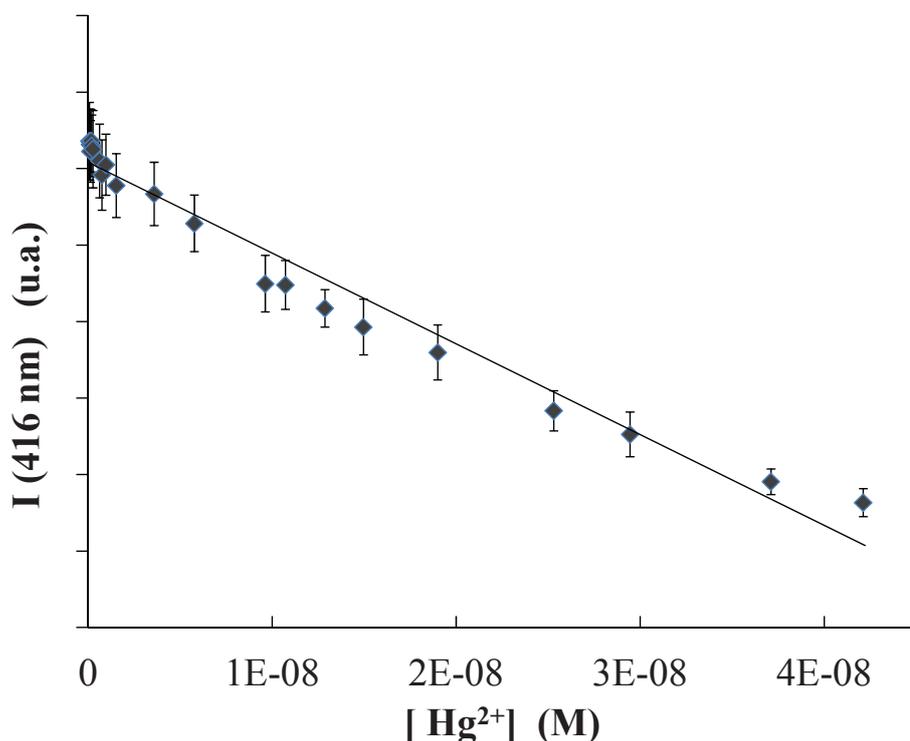


Figura 6.12. Variación de la intensidad de emisión de fluorescencia del sistema M1NA frente a adiciones crecientes de Hg(II), $\lambda_{\text{exc.}} = 350 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{emis.}} = 416 \text{ nm}$.

En la tabla 1 se muestran los resultados para ambos sistemas obtenidos a partir de la media de tres valoraciones independientes. En los dos casos se ha obtenido un límite de detección bastante inferior al máximo permitido por la agencia de protección ambiental (EPA) para el agua de consumo, que está fijado en 2 ppb.²

Tabla 1. Valores de límite de detección de Hg(II) para los sistemas híbridos M1NA y M3NA medidos en disolución acuosa a pH 5.

Sistema	Límite de detección (ppb)
M1NA	0.19 ± 0.01
M3NA	0.37 ± 0.03

En la figura 6.13 se muestra una imagen en la que se ha preparado una disolución acuosa de M1NA y otra que contiene el sistema híbrido junto con una cantidad equimolecular de mercurio, donde se puede ver que la adición de mercurio inhibe prácticamente la emisión de fluorescencia del antraceno en las condiciones experimentales de trabajo.



Figura 6.13. Imagen de dos disoluciones de M1NA con (izquierda) y sin (derecha) Hg(II).

6.5. Conclusiones.

En este trabajo de investigación ha sido posible desarrollar un sistema híbrido capaz de detectar mercurio en disolución acuosa. Para ello se han sintetizado nanopartículas de 10 nm de diámetro con arquitectura núcleo-envoltura. La superficie de las nanopartículas se ha modificado con poliaminas abiertas sencillas, cuya síntesis no ha implicado un gran esfuerzo sintético en comparación con otras moléculas orgánicas sintetizadas para la detección de Hg(II).²⁶

El sistema híbrido M1NA, que tiene una única amina en su estructura, es el que mejor sensibilidad ha demostrado hacia la detección de Hg(II), con un límite de detección por debajo de la regulación establecida por la EPA.

Los estudios se han realizado a 2 pHs diferentes, mostrando una mayor eficacia a pH 5, donde el sistema híbrido M1NA ha sido capaz de detectar Hg(II), mientras que el resto de metales ensayados no ha producido ningún cambio en la respuesta fotoquímica del quimiosensor híbrido.

Se ha podido medir el límite de detección siendo en todos los casos inferior al límite establecido por la EPA para el agua de consumo.

6.6. Bibliografía.

[1] a) P. Grandjean, P. Weihe, R. F. White, F. Debes, *Environmental Research*, 1998, 77, 165. b) I. Onyido, A. R. Norris, E. Buncel, *Chem. Rev.*, 2004, 104, 5911.

[2] United States Environmental Protection Agency Roadmap for Mercury, 2006, EPA-HQ-OPPT 2005-0013.

[3] *Inorganic mercury*. Geneva, World Health Organization, 1991 (Environmental Health Criteria, No. 118).

[4] J. Pacyna, S. Wilson, F. Steenhuisen, E. Pacyna, <http://www.amap.no/Resources/HgEmissions/HgInventoryData.html>, 2005.

[5] N. E. Selin, *Annu. Rev. Environ. Resour.* 2009, 34, 43.

[6] a) O. T. Butler, J. M. Cook, C. F. Harrington, S. J. Hill, J. Rieuwerts, D. L. Miles, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2006, 21, 217. b) J. L. Capelo, C. Maduro, A. M. Mota, *Ultrason. Sonochem.*, 2006, 13, 98. c) F. Ubillus, A. Alegria, R. Barbera, R. Farre, M. J. Lagarda, *Food Chem.*, 2000, 71, 529.

[7] S. Arzhantsev, X. Li, J. F. Kauffman, *Anal. Chem.*, 2011, 83, 1061.

[8] a) A. Doménech, M. T. Doménech-Carbó, E. García-España, M. D. Soriano, *Analyst*, 1999, 124, 1661. b) A. N. Onar, A. Temizer, *Analyst*, 1987, 112, 227. c) A. Caballero, R. Martínez, V. Lloveras, I. Ratera, J. Vidal-Gancedo, K. Wurst, A. Tárraga, P. Molina. J. Veciana, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, 127, 15666. d) D. Jiménez, R. Martínez-Máñez, F. Sancenón, J. Soto, *Tetrahedron Lett.*, 2004, 45, 1257.

[9] Y. F. Li, C. Y. Chen, B. Li, J. Sun, J. X. Wang, Y. X. Gao, Y. L. Zhao, Z. F. Chai, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2006, 21, 94.

[10] a) T.-L. Kao, C.-C. Wang, Y.-T. Pan, Y.-J. Shiao, J.-Y. Yen, C.-L. Shu, G.-H. Lee, S.-M. Peng, W.-S. Chung, *J. Org. Chem.*, 2005, 70, 2912. b) R. Martínez, A. Espinosa, A. Tárraga, P. Molina, *Org. Lett.*, 2005, 26, 5869.

- [11] M. L. P. Reddy, T. Francis, *Solvent Extr. Ion Exch.*, 2001, 19, 839.
- [12] M. L. Helm, G. P. Helton, D. G. Van Derveer, G. J. Grant, *Inorg. Chem.*, 2005, 44, 5696.
- [13] J. Aragón, A. Bencini, A. Bianchi, A. Doménech, E. García-España, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1992, 319.
- [14] A. P. de Silva, H. Q. N. Gunaratne, T. Gunnlaugsson, A. J. M. Huxley, C. P. McCoy, J. T. Rademacher, T. E. Rice, *Chem. Rev.*, 1997, 97, 1515.
- [15] a) M. T. Albelda, J. C. Frías, E. García-España, S. V. Luis, *Org. Biomol. Chem.*, 2004, 2, 816. b) A. Bencini, A. Bianchi, E. García-España, M. Micheloni, J. A. Ramírez, *Coord. Chem. Rev.*, 1999, 188, 97.
- [16] M. Ferrari, *Nature Reviews Cancer*, 2005, 5, 161. b) W. J. Stark, P. R. Stoessel, W. Wohlleben and A. Hafner, *Chem. Soc. Rev.*, 2015, 44, 5793. c) K. E. Sapsford, W. R. Algar, L. Berti, K. B. Gemmill, B. J. Casey, E. Oh, M. H. Stewart, I. L. Medintz, *Chem. Rev.*, 2013, 113, 1904.
- [17] I. A. Rahman, V. Padavettan, *J. Nanomater.*, 2012, 2012, Article ID 132424, 15 pages.
- [18] F. A. Cotton, C. Murillo, G. Wilkinson, M. Bochmann, R. Grimes, *Advanced Inorganic Chemistry*, John Wiley & Sons, 1999.
- [19] A. Nakajima, *J. Lumin.*, 1977, 15, 277.
- [20] a) A. Bencini, A. Bianchi, E. García-España, M. Micheloni, J. A. Ramírez, *Coord. Chem. Rev.*, 1999, 188, 97. b) M. T. Albelda, J. C. Frías, E. García-España, Proton Transfer Reactions, *Encyclopedia of Supramolecular Chemistry*, 2007, 1, 1. c) B. Dietrich, M. W. Hosseini, J.-M. Lehn, R. Sessions, *Helv. Chim. Acta*, 1983, 66, 1262. d) E. García-España, S. V. Luis, *Supramol. Chem.*, 1996, 6, 257.
- [21] L. Fabrizzi, P. Pallavicini, L. Parodi, A. Taglietti, *Transition Metals in Supramolecular Chemistry*, John Wiley & Sons Ltd, New York, 1999.
- [22] a) Z. Xu, J. Yoon, D. R. Spring, *Chem. Soc. Rev.*, 2010, 39, 1996. b) J. F. Zhang, J. S. Kim, *Anal. Sci.* 2009, 25, 1271. c) A. P. de Silva, H. Q. N. Gunaratne, T. Gunnlaugsson, A. J. M. Huxley, C. P. McCoy, J. T. Rademacher, T. E. Rice, *Chem. Rev.* 1997, 97, 1515.

[23] a) D. S. McClure, *J. Chem. Phys.* 1949, 17, 905. b) K. N. Solovyov, E. A. Borisevich, *E. A. Phys. Uspekii, Adv. Phys. Sci.*, 2005, 48, 231. b) C. Bazzicalupi, A. Bencini, E. Berni, A. Bianchi, P. Fornasari, C. Giorgi, B. Valtancoli, *Eur. J. Inorg. Chem.* 2003, 1974. c) Y. Mikata, W. Wakamatsu, A. Kawamura, N. Yamanaka, S. Yano, A. Odani, K. Morihiro, S. Tamotsu, *Inorg. Chem.*, 2006, 45, 9262. d) N. J. Williams, W. Gan, J. H. Reibenspies, R. D. Hancock, *Inorg. Chem.*, 2009, 48, 1407.

[24] R. M. Smith and A. E. Martell, *NIST Stability Constants Database*, version 4.0, National Institute of Standards and Technology, Washington D.C., 1997.

[25] N. Gimeno, X. Li, J. R. Durrant, R. Vilar, *Chem. Eur. J.*, 2008, 14, 3006.

[26] a) J. K. Choi, G. Sargsyan, A. M. Olive, M. Balaz, *Chem. Eur. J.* 2013, 19, 2515. b) D. Wu, A. B. Descalzo, F. Weik, F. Emmerling, Z. Shen, X.-Z. You, K. Rurack, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2008, 47, 193. c) M. Yuan, Y. Zhu, X. Lou, C. Chen, G. Wei, M. Lan, J. Zhao, *Biosens. Bioelectron.*, 2012, 31, 330.

7.

**Nanopartículas de bohemita modificadas
con complejos de Ln^{3+} :
propiedades ópticas y empleo como
agentes de contraste.**



7.1. Introducción.

7.1.1. Resonancia magnética de imagen.

La resonancia magnética de imagen (MRI, por *magnetic resonance imaging*) es una herramienta de diagnóstico rutinaria en medicina clínica hoy en día. La ventaja más importante de esta técnica frente al resto de técnicas como la tomografía computerizada de rayos X (CT, por *X-Ray Computer Tomography*), la tomografía computerizada de emisión monofotónica (SPECT, por *Single-Photon Emission Computed Tomography*) o la tomografía por emisión de positrones (PET, por *Positron Emission Tomography*) es que no emplea radiación de alta energía perjudicial, es una técnica no invasiva por lo que el tratamiento no es doloroso y tiene una resolución espacial muy buena (se puede llegar al orden de los submilímetros). Para mostrar un poco más las ventajas de esta técnica frente al resto, en la tabla 7.1 se comparan los diferentes parámetros decisivos a la hora de emplear una técnica de diagnóstico u otra.

Tabla 7.1. Comparación de diferentes técnicas de diagnóstico.

Técnica	Resolución	Sensibilidad	Agente responsable de la imagen
MRI	10-100 μm	mM- μm	Iones paramagnéticos
PET	1-2 mm	pM	Emisores de positrones
SPECT	1-2 mm	Sub nM	Emisores gamma
CT	50 μm	mM	Yodo, Bario

En general, la resonancia magnética de imagen es una técnica en la que se aplica un gradiente de campo magnético y una onda de radiofrecuencia (RF por *radio frequency*) a un sujeto en un campo magnético estático. La MRI utiliza los espines nucleares de los hidrógenos

(protones) de las moléculas de agua que se encuentran en el cuerpo humano, que son polarizados por el campo magnético generado en el equipo. Como consecuencia se obtiene una imagen basada en las señales de resonancia magnética emitidas por los protones que se encuentran en la región examinada.

Desde un punto de vista más técnico, cuando se aplica un campo magnético de alta frecuencia a una muestra (o persona) los espines nucleares de los protones presentes en los tejidos se excitan y rotan a una velocidad que depende del campo magnético estático aplicado. Cuando el campo aplicado acaba, los espines vuelven al estado fundamental interaccionando con el medio que los rodea a través de un proceso llamado relajación. El tiempo necesario para completar ese proceso se conoce como tiempo de relajación y es el principal parámetro que se emplea a la hora de producir las imágenes de MRI. Se pueden diferenciar dos tiempos de relajación: longitudinal (T_1) y transversal (T_2).¹

- T_1 . En un experimento convencional de resonancia magnética, se aplican pulsos RF a los protones con un tiempo de retardo entre los pulsos. El tiempo que emplean los protones excitados en ceder la energía absorbida al medio se define como tiempo de relajación longitudinal (tiempo de relajación espín-medio).
- T_2 . También puede ocurrir que el protón excitado transfiera su energía absorbida, no al medio que lo rodea, sino a un protón que se encuentre cercano en el espacio. El tiempo empleado en ceder esa energía se define como tiempo de relajación transversal (tiempo de relajación espín-espín).²

Cuando se utiliza la técnica de MRI, lo que se observa son los átomos de hidrógeno provenientes de las moléculas de agua que se

encuentra en los tejidos. Mediante el empleo de diferentes secuencias de pulsos de radiofrecuencia y dependiendo del tipo de tejido, de la densidad de agua y del medio, se pueden encontrar diferencias en las imágenes de resonancia al medir los tiempos de relajación T_1 y T_2 (figura 7.1).

Sin embargo, el contraste que se puede encontrar entre dos tejidos mediante esta técnica no es suficiente para el diagnóstico de enfermedades (el cambio brillo-oscuridad presente en las imágenes). Por tanto, la introducción de sustancias externas que puedan mejorar las imágenes de resonancia es necesaria. Estas sustancias se llaman agentes de contraste (CA, por *contrast agent*) y su función es disminuir los tiempos de relajación T_1 y T_2 .

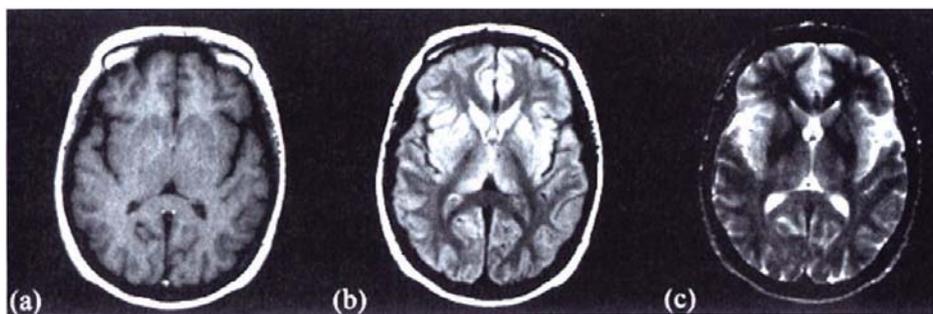


Figura 7.1. Imágenes de resonancia magnética de imagen de a) una sección del cerebro, b) medida respecto a T_1 y c) medida respecto a T_2 . (Imagen tomada de la referencia 1).

Las sustancias que pueden actuar como agentes de contraste se pueden agrupar en paramagnéticas, superparamagnéticas o ferromagnéticas. Se pueden distinguir dos familias de CAs principalmente, que se caracterizan por el tiempo de relajación magnético al que afectan. Por un lado se tienen los agentes de contraste de tipo T_1 o paramagnéticos donde se observa un contraste positivo o lo que es lo mismo un aumento en la luminosidad del tejido observado. En el lado opuesto aparecen los

agentes de contraste de tipo T_2 o superparamagnéticos, donde el efecto es el contrario. El CA provoca una disminución local de la señal del protón, lo que se traduce en un oscurecimiento de los tejidos. Históricamente, la química de los T_1 -CAs se ha desarrollado en mayor medida que los CA que afectan al T_2 debido a que el tiempo de relajación T_1 de disoluciones de agua diamagnéticas es alrededor de cinco veces mayor que T_2 y por lo tanto, es más sencillo provocar una disminución en el T_1 mediante un agente extern:¹

- En la figura 7.2 se muestra un ejemplo del efecto que tiene un agente de contraste positivo. El uso de un complejo de gadolinio aumenta el brillo de la zona afectada.
- En la figura 7.3 se muestra el oscurecimiento de la zona afectada cuando se emplea un agente de contraste que modifica el tiempo de relajación T_2 .

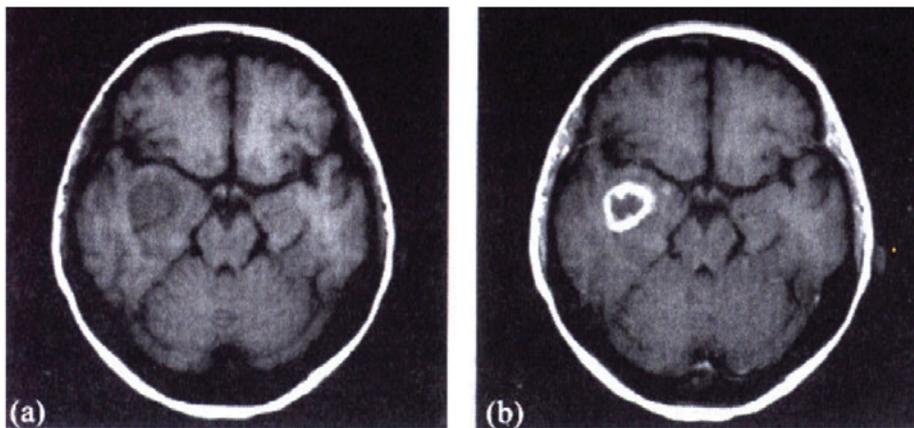


Figura 7.2. Efecto de un agente de contraste de tipo T_1 en la visualización de una lesión en el cerebro. (a) sin contraste y (b) con contraste. (Imagen tomada de la referencia 1).

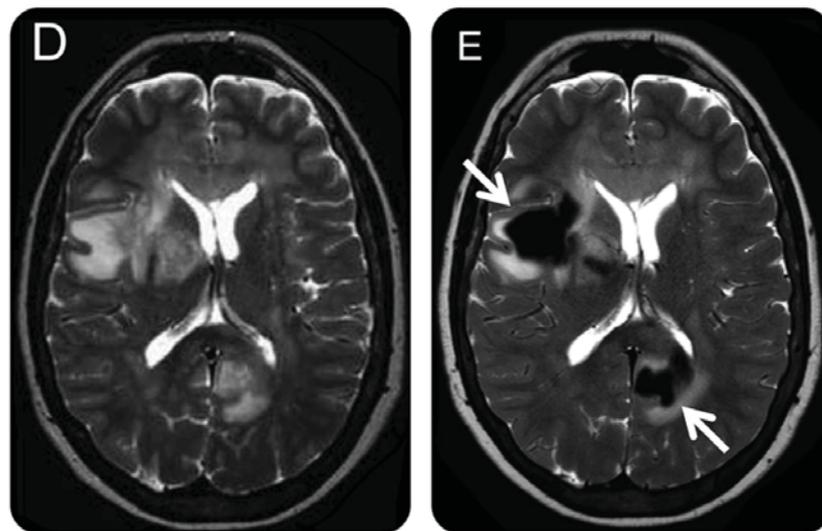


Figure 7.3. Efecto de un agente de contraste de tipo T_2 en la visualización de una lesión en el cerebro, (D) sin contraste y (E) con contraste.

7.1.2. Agentes de contraste basados en complejos de Gd(III).

Los agentes de contraste basados en los iones paramagnéticos Mn(II), Mn(III), Fe(III) y Cu(II) han sido empleados para modificar T_1 . Sin embargo, los complejos de Gd(III) son de lejos los más empleados como agentes de contraste en la práctica clínica por las características que presenta este catión. El Gd(III) tiene siete electrones desapareados, lo que le convierte en el ion con uno de los mayores grados de paramagnetismo. Además, tiene una relajación electrónica lenta, lo que provoca un aumento de la relajación de los protones que se encuentran a su alrededor.³

Aunque las características electrónicas hacen del Gd(III) un buen candidato para actuar como CA, su administración a organismos vivos no se puede llevar a cabo si se encuentra en su forma libre, ya que induce un alto grado de toxicidad: bloquea los canales de calcio (debido a que el Gd(III) tiene un tamaño similar al Ca(II)) y puede afectar al buen

funcionamiento de algunas enzimas al provocar la transmetalación con otros iones metálicos.⁴ Además, el catión Gd(III) puede formar hidroxocomplejos y precipitar a pH fisiológico. Se estima que los valores de LD₅₀ para el Gd(III) se encuentran dentro del intervalo de 0.1-2 mmol/kg. Por ello, es muy importante el desarrollo de ligandos multidentados (por ej. las moléculas de tipo poliaminocarboxilatos) que sean capaces de complejar el catión de manera muy estable para poder llevar a cabo su uso en terapias *in vivo*.

Como se ha comentado anteriormente, la eficacia de un agente de contraste paramagnético se basa en su capacidad de acortar o disminuir el tiempo de relajación T_1 de los protones del agua presentes en un tejido. De acuerdo con la teoría establecida por Solomon-Bloembergen-Morgan (SBM) y su desarrollo posterior denominada de forma general como GSBM,⁵ se puede definir una velocidad de relajación longitudinal R_1 como la inversa del tiempo de relajación correspondiente ($R_1 = (1/T_1)$), y es función de la velocidad diamagnética R_d y paramagnética R_p (ecuación 1).

$$\frac{1}{T_1} = \frac{1}{T_d} + \frac{1}{T_p} \quad \text{o} \quad R_1 = R_d + R_p \quad (\text{ec.1})$$

Cuando ninguna sustancia paramagnética se encuentra presente en la disolución, la velocidad de relajación global que se observa es la correspondiente a la velocidad de relajación diamagnética. Cuando un complejo de Gd(III) se añade a la disolución, se produce un aumento de la velocidad de relajación debido a la presencia del complejo paramagnético adicionado, y el aumento observado es directamente proporcional a la concentración de Gd(III) presente (ecuación 2).

$$R_1 = R_d + r \cdot [\text{Gd(III)}] \quad (\text{ec.2})$$

A partir de esta ecuación es posible obtener el término r (en $\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) llamado relajatividad. Este parámetro hace referencia a la habilidad que tiene el complejo paramagnético de aumentar la velocidad de relajación de los protones del agua que se encuentran a su alrededor. Por lo tanto, cuanto mayor es la relajatividad que puede inducir el CA, mayor es la velocidad de relajación y por lo tanto, menor es el tiempo de relajación observado, lo que se traduce en un mejor agente de contraste.

Desde un punto de vista físico-químico, r puede verse afectado por diferentes parámetros. En la figura 7.4 se han representado aquellos factores que van a influir en el entorno químico del catión paramagnético y que en cierta medida pueden ser modificados en la etapa de diseño y síntesis de los sistemas que complejarán al catión paramagnético.⁶

- q hace referencia al número de moléculas de agua presentes en la esfera interna que se encuentran directamente coordinadas al catión Gd(III). Un aumento de q se traduce en un aumento de la relajatividad ya que hay un mayor número de protones en contacto con el catión paramagnético. Sin embargo, el número máximo de moléculas de agua coordinadas es tres, ya que un mayor número implica una disminución de la estabilidad del complejo y por tanto un aumento de la toxicidad debido a la liberación de Gd(III).⁷
- τ_M hace referencia al tiempo de vida media que las moléculas de agua permanecen en la esfera de coordinación interna del centro metálico. Una disminución de τ_M permite que un mayor número de moléculas de agua entren en contacto con el Gd(III) y por lo tanto la relajatividad aumenta. Sin embargo, si el término τ_M disminuye demasiado, la relajatividad también lo hará ya que los protones de las moléculas de

agua no estarán el tiempo suficiente coordinadas al Gd(III) para que su relajación frente a un campo magnético se vea influenciada.

- τ_R hace referencia al tiempo de vida media de rotación molecular del complejo. Un tiempo de vida largo se traduce en un aumento de la relajatividad.
- T_{1e} hace referencia al tiempo de relajación longitudinal de spin del ión metálico. Existe una interdependencia entre los parámetros τ_R , τ_M , y T_{1e} , de manera que para los complejos de Gd(III) de pequeño tamaño, τ_R es la variable limitante de las tres.
- r_{GdH} hace referencia a la distancia efectiva entre la molécula de agua y el spin electrónico del Gd(III). Una disminución de este parámetro se traduce en un aumento de la relajatividad.
- q_{ss} y τ_{Mss} hacen referencia a la interacción del complejo con las moléculas de agua situadas en la segunda esfera de coordinación y en esferas más externas, es decir, el número de hidratación del complejo y el tiempo medio de residencia de esas moléculas de agua respectivamente.

Estos parámetros se pueden optimizar y se ha comprobado que un diseño racional de los ligandos influye de manera notable sobre q , τ_M y τ_R , fundamentalmente.

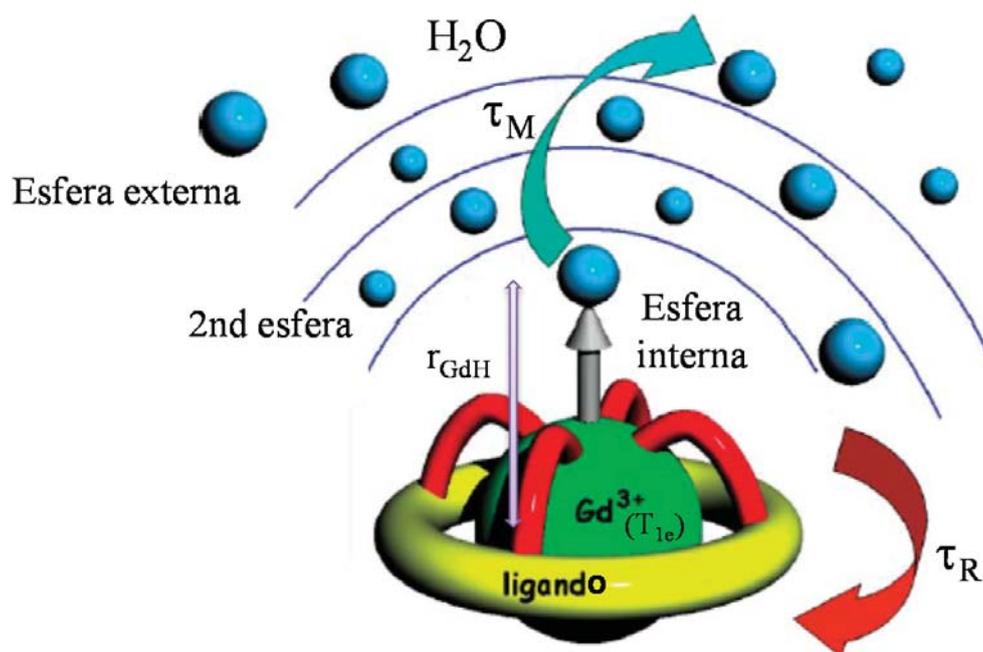


Figura 7.4. Modelo que muestra los principales parámetros que se pueden modificar a la hora de diseñar un agente de contraste basado en Gd(III).³

7.1.3. Lantánidos.

El término lantánidos (o lantanoides) se refiere de manera general a los elementos de la serie del bloque *f* desde el lantano al lutecio. En la naturaleza se pueden encontrar casi de manera exclusiva en un estado de oxidación trivalente y su importancia radica fundamentalmente en sus propiedades luminiscentes, que hacen que su uso en sondas biológicas esté ampliamente desarrollado.⁸

Aunque todos los iones Ln(III) son luminiscentes (a excepción del La y el Lu), no todos pueden ser candidatos para el desarrollo de sondas ópticas. Es necesario que la separación (gap) energética entre el estado

fundamental y el primer estado excitado sea lo suficientemente grande para maximizar el proceso de luminiscencia frente a otros procesos de relajación no radiativos.⁹ El europio, el gadolinio y el terbio cumplen este requisito al tener una separación energética de 12300, 32200 y 14800 cm⁻¹ respectivamente. Sin embargo, a pesar que el gadolinio cumple con esta condición emite en el rango del ultravioleta, por lo que no puede ser empleado en aplicaciones biológicas.

7.1.3.1. Emisión del europio y del terbio.

El europio emite en la región roja del espectro mientras que el terbio lo hace en la región del verde (figura 7.5). El estado emisor del ion Eu(III) es un ⁵D₀ y las principales bandas (las más intensas) que se observan en el espectro de emisión son debidas a las transiciones ⁵D₀ → ⁷F₁ y ⁵D₀ → ⁷F₂. El Tb(III) experimenta la desactivación desde un estado excitado ⁵D₄ dando lugar a cuatro bandas de emisión de las cuales las más intensas son las transiciones ⁵D₄ → ⁷F₅ y ⁵D₄ → ⁷F₆.¹⁰ En la tabla 7.2 se recogen todas las transiciones posibles de ambos iones trivalentes con sus características espectrales.¹¹

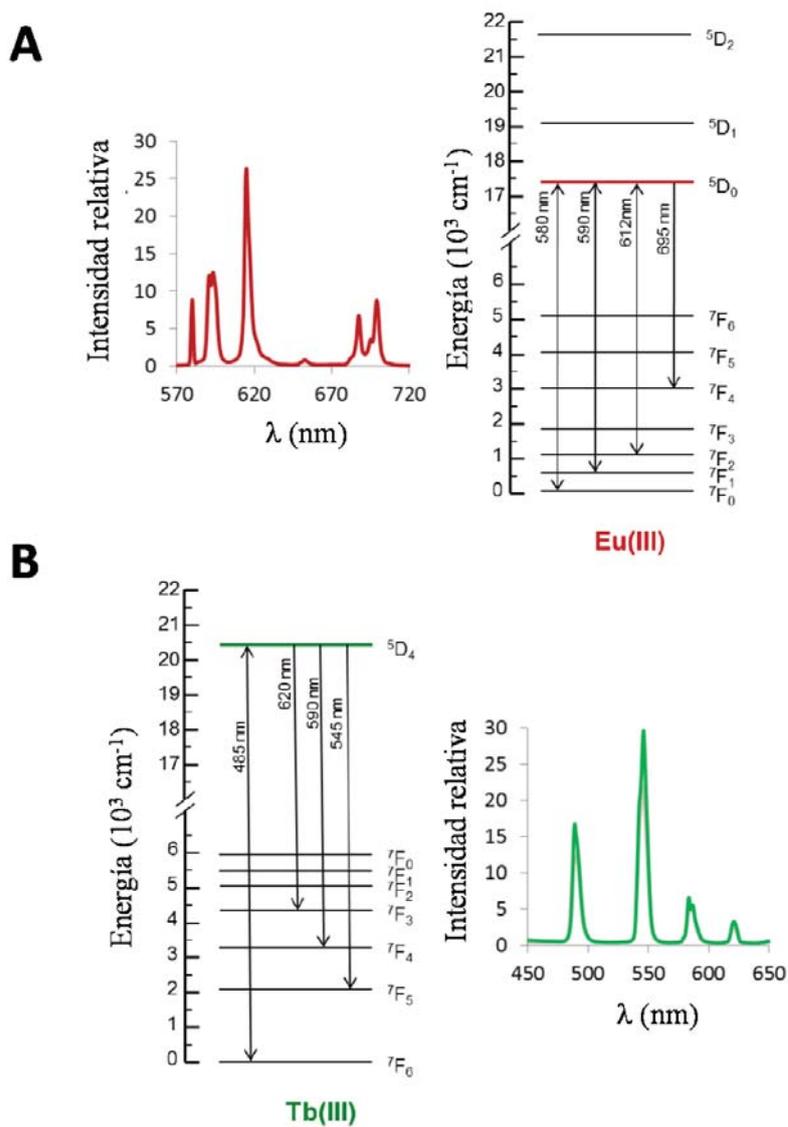


Figura 7.5. Diagramas parciales de niveles energéticos y espectros de emisión típicos de Eu(III) (A) y Tb(III) (B).

Tabla 7.2. Bandas de emisión características de los iones Eu(III) y Tb(III).¹¹

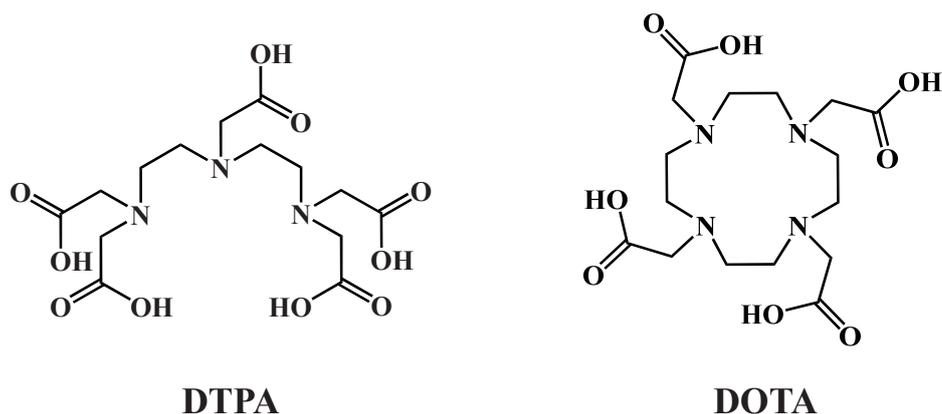
Tansición	Región espectral (nm)	Intensidad relativa	Comentarios
<i>Terbio</i>			
$^5D_4 \rightarrow ^7F_6$	485 – 500	media-alta	Sensibilidad moderada al entorno
$\rightarrow ^7F_5$	540 – 555	alta	Utilizada en sondas biológicas
$\rightarrow ^7F_4$	580 – 595	media	Sensibilidad moderada al entorno
$\rightarrow ^7F_3$	615 – 625	media-baja	Se aprecia cierta estructura medida en alta resolución
$\rightarrow ^7F_2$	645 - 655	baja	Demasiado débil
<i>Europio</i>			
$^5D_0 \rightarrow ^7F_0$	578 – 580	baja	Aparece como una banda ancha
$\rightarrow ^7F_1$	585 – 600	alta	En condiciones de alta resolución se observan hasta tres transiciones
$\rightarrow ^7F_2$	610 – 630	alta	Alta sensibilidad al entorno
$\rightarrow ^7F_3$	645 – 660	muy baja	Muy débil en cualquier condición
$\rightarrow ^7F_4$	680 - 705	media	Intensidad y estructura muy sensible al entorno

7.2. Sistemas híbridos empleados como agentes de contraste y sondas luminiscentes.

Muchos de los agentes de contraste comerciales que se encuentran disponibles hoy en día se basan en complejos con moléculas orgánicas libres (Dotarem®, ProHance®, Magnevist®, Omniscan®). Sin embargo, el tremendo desarrollo que ha experimentado la nanotecnología en las últimas décadas ha propiciado el desarrollo de nuevos tipos de sondas basados en nanopartículas. Ya hemos comentado de manera más extensa en otros capítulos de la presente tesis doctoral que las propiedades físicas y químicas que tienen las nanopartículas debido a su tamaño y a la naturaleza de su composición han propiciado su uso en el desarrollo de sondas de reconocimiento y además se han utilizado ampliamente en la síntesis de una nueva generación de agentes de contraste.¹²

Una de las ventajas más importantes que ofrecen las nanopartículas es su elevada superficie específica que aumenta la reactividad química del material, por lo que es posible modificar la superficie con otras sustancias que exhiben otra clase de propiedades. Además, el empleo de nanopartículas como plataformas de agentes de contraste permite la modificación de los parámetros que afectan al valor final de la relajatividad y por lo tanto, a la efectividad del sistema híbrido como agente de contraste.¹³

Existen dos moléculas orgánicas que han sido utilizadas ampliamente en el desarrollo de CAs basados en Gd(III) de acuerdo con la literatura.¹⁴ Una de ellas es el ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) y la otra el ácido 1,4,7,10-tetrazaciclododecanotetraacético (DOTA) (esquema 7.1).



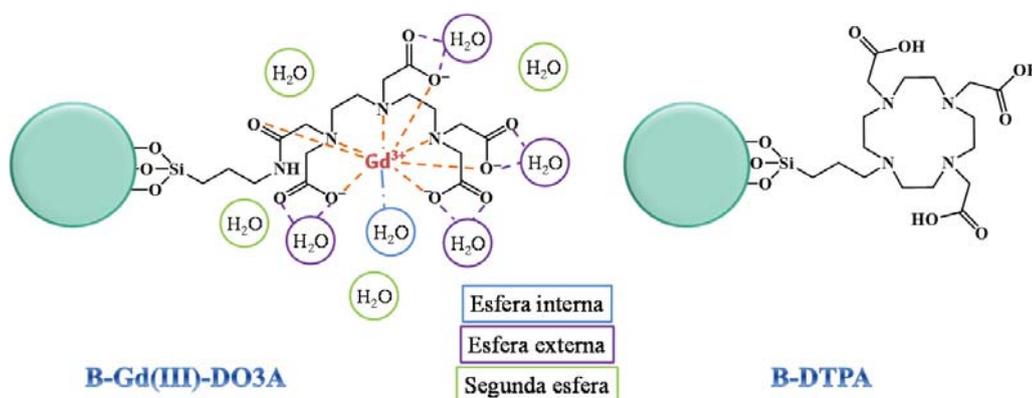
Esquema 7.1. Estructuras orgánicas de los ligandos DTPA y DOTA.

El DTPA consiste en una cadena poliamínica que actúa como esqueleto en el que se localizan cinco grupos acetato. Hay cuatro diastereoisómeros posibles del ligando bis(amida)DTPA (*cis*, *trans*, *syn* y *anti*) debido a la flexibilidad que presenta su estructura. Cada diastereoisómero existe en dos formas enantioméricas por lo que existen ocho posibles isómeros de coordinación.¹⁵ El DOTA es un macrociclo de doce miembros que presenta cuatro cadenas laterales de tipo acetato. Cuando se forma el complejo con Gd(III) éste tiene una carga formal de -1 y la estabilidad del complejo tanto cinética como termodinámica es algo mayor al complejo de Gd-DTPA debido a la preorganización que el macrociclo proporciona. Esta clase de ligandos multidentados macrocíclicos pueden estabilizar al ion Gd(III) en mayor medida, debido a que disminuyen la entropía por un efecto quelato en comparación con ligandos de tipo monodentado.

Dado que la química y el uso como agentes de contraste de los complejos de Gd(III) con estas dos moléculas es ampliamente conocida,³ uno de los objetivos de la presente tesis doctoral ha sido la modificación de estos sistemas con el fin de mejorar los valores de la relajatividad (r).

Para ello, se ha decidido anclar estas moléculas a la superficie de nanopartículas de bohemita (indicada en los nombres de los sistemas híbridos sintetizados como B) y estudiar su viabilidad como agentes de contraste. Mediante esta estrategia se puede concentrar una gran cantidad de complejos de Gd(III) en una única nanopartícula y, debido al gran tamaño de la nanopartícula en comparación con el complejo libre se puede disminuir la velocidad de rotación molecular (τ_R) y aumentar por tanto la relajatividad (r).

En el esquema 7.2 se muestra la estructura de los sistemas híbridos. En el caso del sistema híbrido con Gd(III)-DTPA se ha representado una posible estructura de coordinación del complejo junto con las diferentes capas de hidratación que se formarían al dispersar las nanopartículas funcionalizadas en un medio acuoso.



Esquema 7.2. Esquema de los sistemas híbridos sintetizados y posible estructura de coordinación para el sistema Gd(III)-DO3A-bohemita.

Para llevar a cabo la funcionalización de las nanopartículas de bohemita con las moléculas DOTA y DTPA se ha realizado alguna modificación en su estructura. En el caso del DOTA, se ha eliminado uno de los grupos acetato y se ha sustituido por un grupo silano para poder

llevar a cabo la unión a la superficie sólida. En el caso del DTPA, la modificación se ha producido directamente sobre uno de los grupos acetato (ver capítulo de síntesis). Ninguna de estas modificaciones ha causado una disminución en la estabilidad termodinámica de los complejos como se demostrará más adelante.

7.2.1. Caracterización de los complejos con Eu(III), Tb(III) y Gd(III).

El Gd(III) emite en la región del ultravioleta. Sin embargo, su luminiscencia sólo se puede observar en ausencia de ligandos orgánicos ya que éstos desactivan la emisión de fluorescencia. Debido a la imposibilidad de realizar estudios fotoquímicos con los complejos de Gd(III) se decidió preparar los complejos con otros lantánidos que mostraran emisión de fluorescencia en el infrarrojo cercano. Se eligieron los cationes Eu(III) y Tb(III) ya que tienen propiedades físicas y químicas parecidas al Gd(III). Dado que el comportamiento de los complejos de estos tres lantánidos es similar, los valores obtenidos de q para el Eu(III) y el Tb(III) se aceptan para los complejos análogos de Gd(III). Además, los resultados obtenidos a partir de los complejos de Eu(III) y Tb(III) permitirán su evaluación como posibles sondas biológicas luminiscentes. Una vez sintetizados y caracterizados los sistemas híbridos B-DTPA y B-DO3A, se prepararon los complejos con los lantánidos Eu(III), Tb(III) y Gd(III).

Para comprobar la formación de los complejos se llevaron a cabo medidas de espectrometría por dispersión de energías de rayos X (EDX, por *Energy-dispersive X-ray spectroscopy*) que nos permiten conocer la composición química de las nanopartículas funcionalizadas. En la figura 7.6 se muestran los resultados para el sistema híbrido B-Ln(III)-DO3A. En

el espectro se pueden ver los rayos X de tipo L_{α} y M característicos de los iones Ln(III) estudiados (ver capítulo 3 para información adicional). En todos los casos (tanto para los sistemas B-Ln(III)-DO3A como para los B-Ln(III)-DTPA) la relación atómica entre Si/Ln(III) es igual o muy cercana a la unidad lo que demuestra que todas las moléculas de DO3A y DTPA se encuentran coordinando a un catión Ln(III).

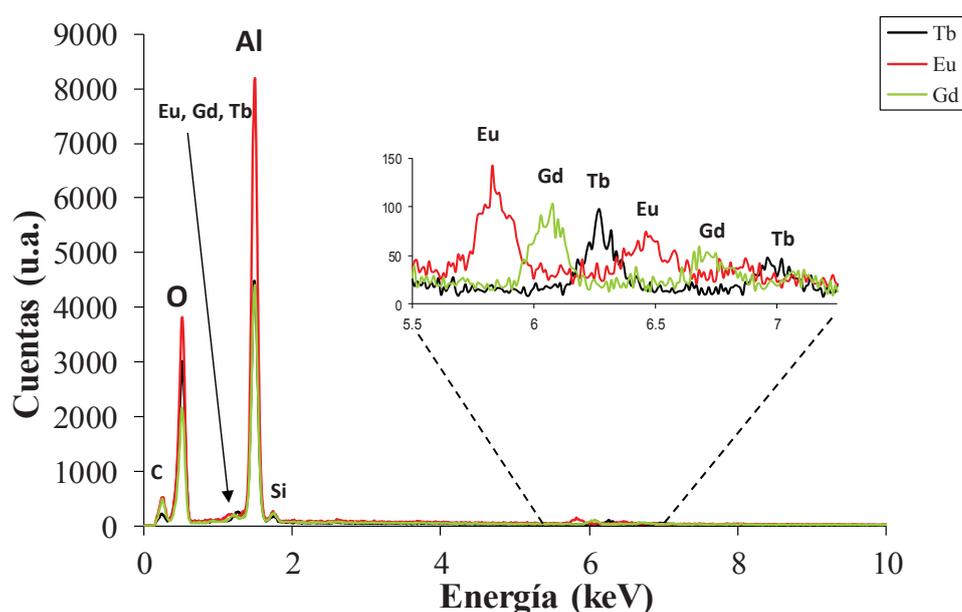


Figura 7.6. Espectro de EDX de los sistemas híbridos B-Ln(III)-DO3A.

Después de comprobar la formación de los complejos, las nanopartículas se volvieron a caracterizar mediante difracción de rayos X (XRD, por *powder X-ray diffraction*) y microscopía electrónica de transmisión (TEM, por *Transmission electronic microscopy*), para asegurarse que el proceso de complejación con los lantánidos no había modificado la estructura cristalina ni la forma o tamaño de las nanopartículas. En la figura 7.7 se muestran los espectros de XRD para todos los complejos de los sistemas híbridos estudiados. Se puede observar la presencia de los picos característicos de la estructura cristalina de la

bohemita, por lo que la formación de los complejos no ha modificado la matriz de los sólidos. Además, la anchura de las señales confirma que el tamaño de las nanopartículas es pequeño como se puede ver en las imágenes de TEM (figura 7.8).

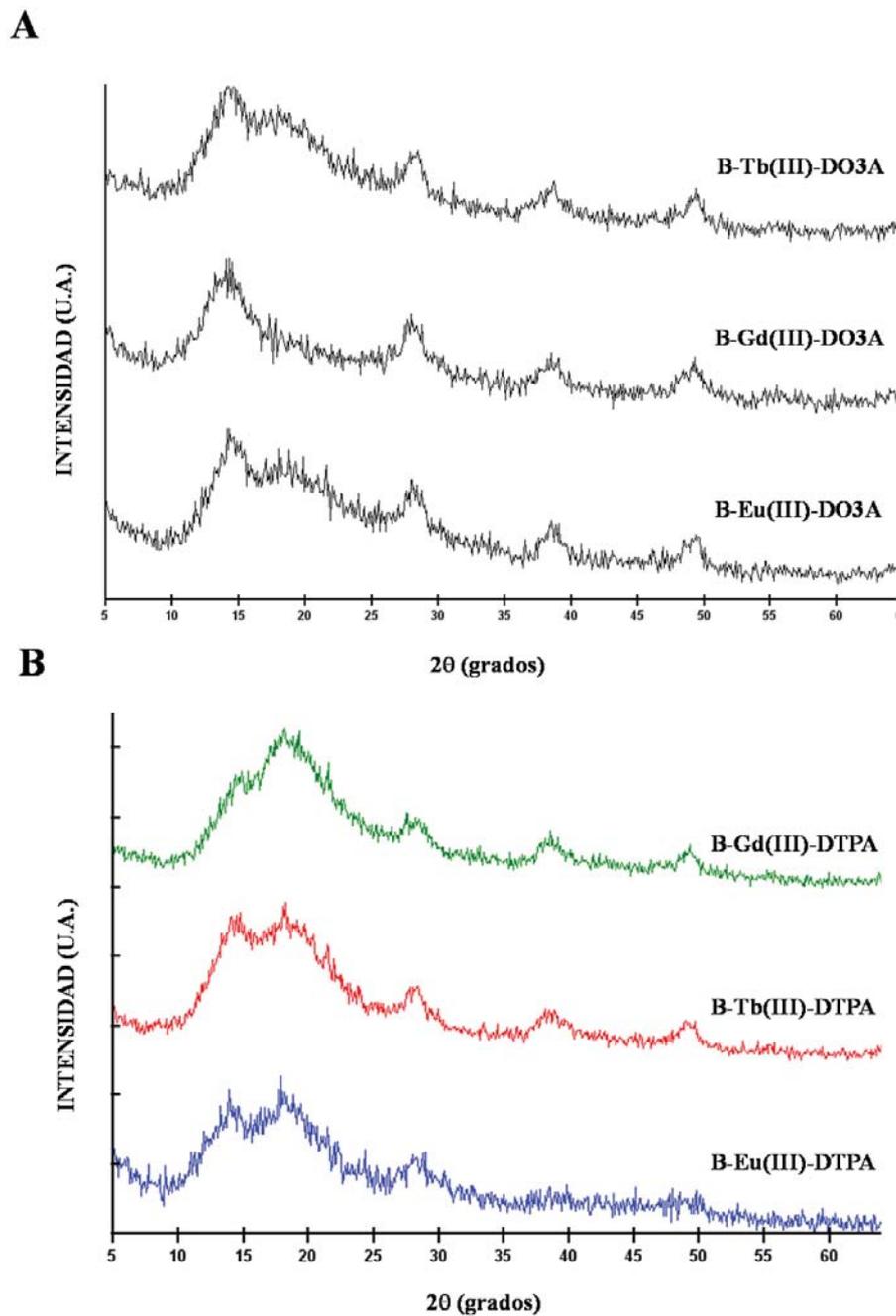


Figura 7.7. Espectros de XRD de B-Ln(III)-DO3A (A) y B-Ln(III)-DTPA (B).

En las imágenes de microscopía se observa que no se ha producido variación ni en la forma ni en el tamaño respecto de las nanopartículas sin funcionalizar (capítulo 5). Como se puede ver en las imágenes, la funcionalización de la superficie, así como la complejación con los Ln(III) no ha afectado a la dispersión de las muestras, ya que se siguen obteniendo dispersiones coloidales sin formación de agregados.

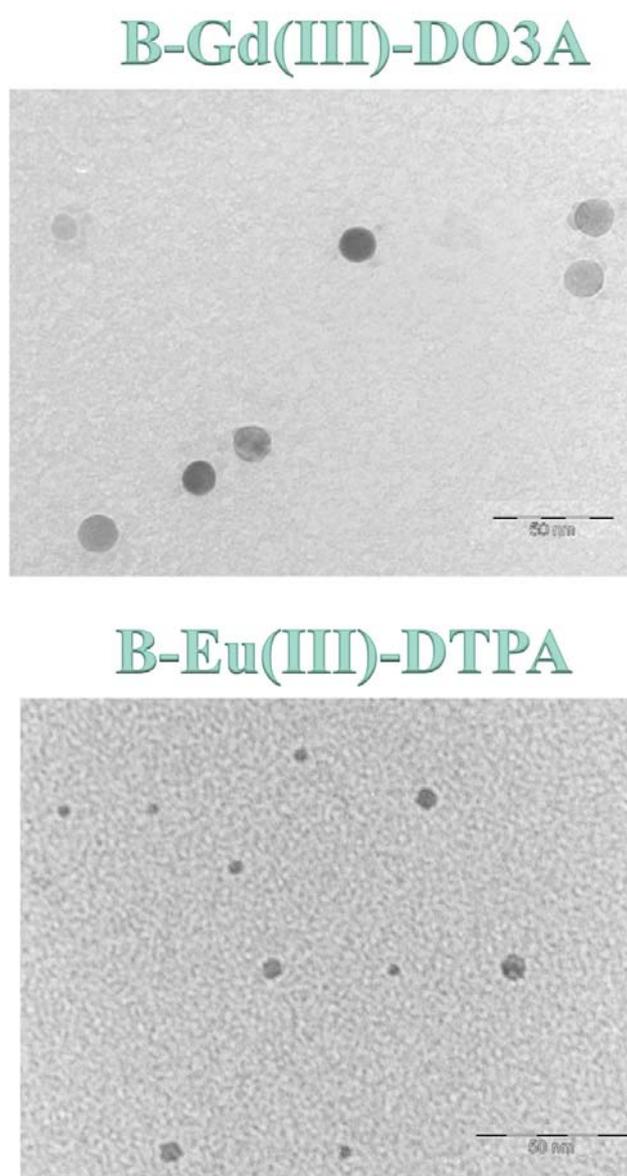


Figura 7.8. Imágenes de TEM de alguno de los sistemas híbridos estudiados (barra de 50 nm).

A partir del diámetro medio de las nanopartículas funcionalizadas (18 nm para el sistema B-Ln(III)-DO3A y 9 nm para el B-Ln(III)-DTPA), junto con los resultados obtenidos del EDX y del análisis elemental, se puede calcular el número de iones lantánido por nanopartícula. En el caso de las nanopartículas funcionalizadas con DO3A la carga iónica se encuentra en el rango de 800-1500 iones mientras que para las nanopartículas funcionalizadas con DTPA la carga es de entre 100-300 cationes de Ln(III).

Por último se midieron los espectros de fluorescencia para ver la emisión de los complejos de Eu(III) y Tb(III). En la figura 7.9 se muestran los resultados obtenidos para los complejos formados con DO3A como unidad receptora junto con los espectros de las correspondientes sales. El complejo con Eu(III) muestra las típicas transiciones desde el estado excitado 5D_0 al estado fundamental 7F_J (siendo $J = 0, 1, 2, 3, 4$), destacando la transición con $\Delta J = 2$. Esta banda es importante ya que es particularmente sensible al entorno químico del lantánido. Los sistemas en los que se han formado los complejos con Tb(III) muestran las cuatro bandas representativas de la luminiscencia del lantánido asociadas a las transiciones desde el estado excitado 5D_4 al estado fundamental 7F_J (siendo $J = 3, 4, 5, 6$).

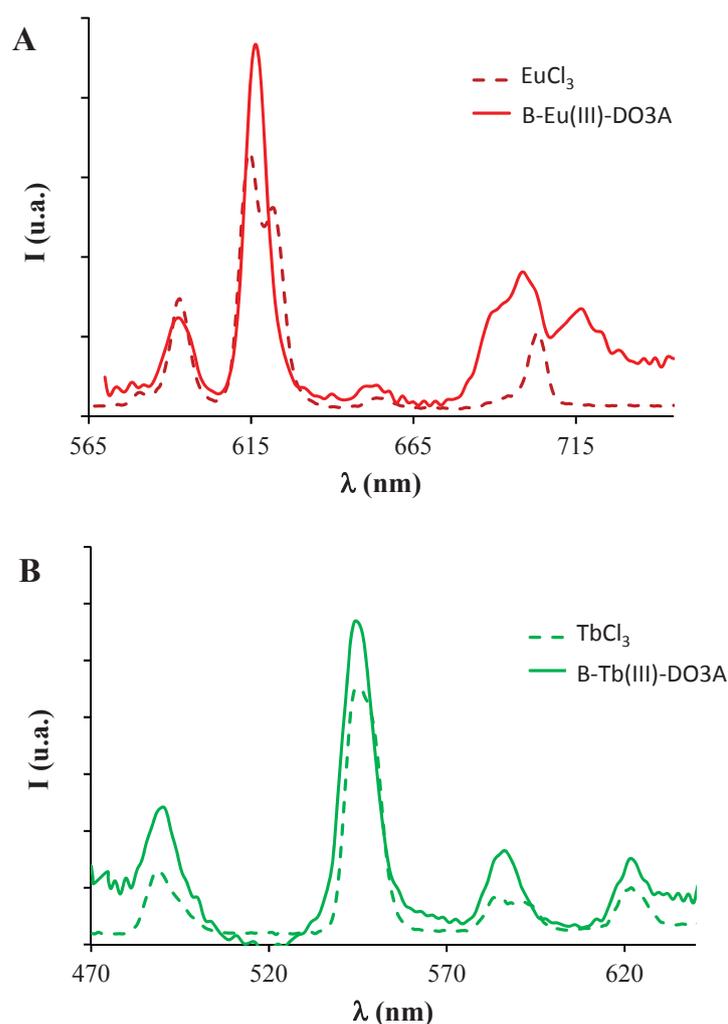


Figura 7.9. Espectros de emisión de los complejos B-Eu(III)-DO3A (A) y B-Tb(III)-DO3A (B) junto con sus correspondientes sales en agua.

$$\lambda_{\text{exc.}}(\text{Eu}) = 396 \text{ nm} \text{ y } \lambda_{\text{exc.}}(\text{Tb}) = 355 \text{ nm.}$$

Al analizar la intensidad relativa de las bandas, la relación entre $\Delta J = 2/\Delta J = 1$ para el sistema B-Ln(III)-DO3A es inusualmente alta, lo que podría indicar la formación de un complejo mixto con carbonato. Para analizar esta posibilidad se realizaron valoraciones de los sistemas híbridos con NaHCO_3 en un medio tamponado con HEPES (pH = 7.4, figura 7.10). La valoración realizada indica que el número de moléculas de agua coordinadas al lantánido permanece constante, ya que por un lado, no se

produce ninguna desactivación de la emisión de fluorescencia al añadir cantidades crecientes de bicarbonato y por otro lado, no hay ninguna variación de la relación $\Delta J = 2/\Delta J = 1$ (la disminución de la emisión de fluorescencia es debida a la dilución de la muestra durante la valoración).¹⁶

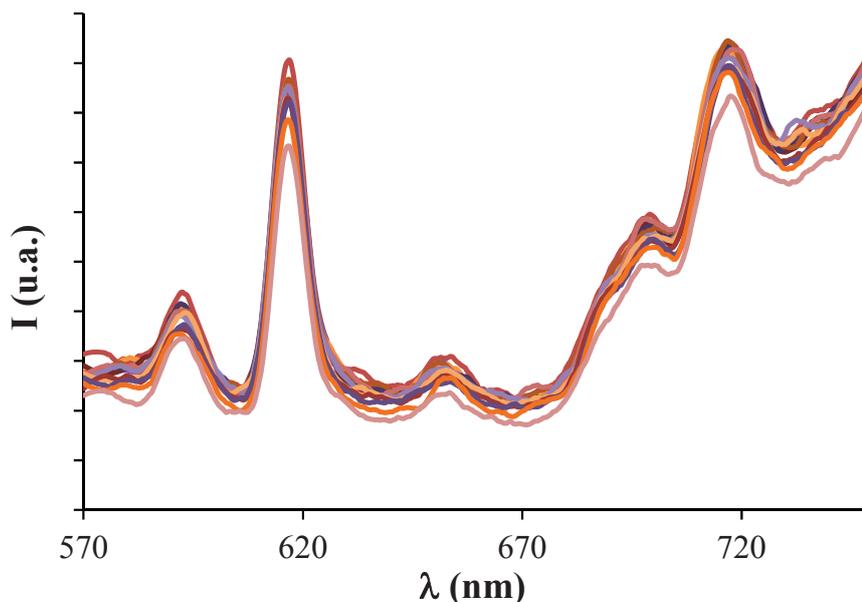


Figura 7.10. Valoración del sistema B-Eu(III)-DO3A con NaHCO₃ en HEPES (0.1 M). $\lambda_{exc.}(Eu) = 396$ nm.

7.2.2. Caracterización del sistema B-Gd(III)-DO3A y B-Gd(III)-DTPA como agentes de contraste.

7.2.2.1. Cálculo de q .

Es posible estimar el número de moléculas de agua que se encuentran en la esfera de coordinación del lantánido mediante la medida de los tiempos de vida media en H₂O y D₂O. El cálculo de este parámetro es importante ya que además de ser un factor que influye en el valor final

de la relajatividad del agente de contraste, da información estructural del propio complejo.

En 1979, Horrocks y Sudnick establecieron que la presencia de H₂O en la primera esfera de coordinación del Eu(III) o del Tb(III) desactiva la emisión de fluorescencia de los lantánidos a través de un mecanismo de transferencia energética que lleva a la relajación no radiativa, mientras que este proceso no tiene lugar en presencia de D₂O (figura 7.11).

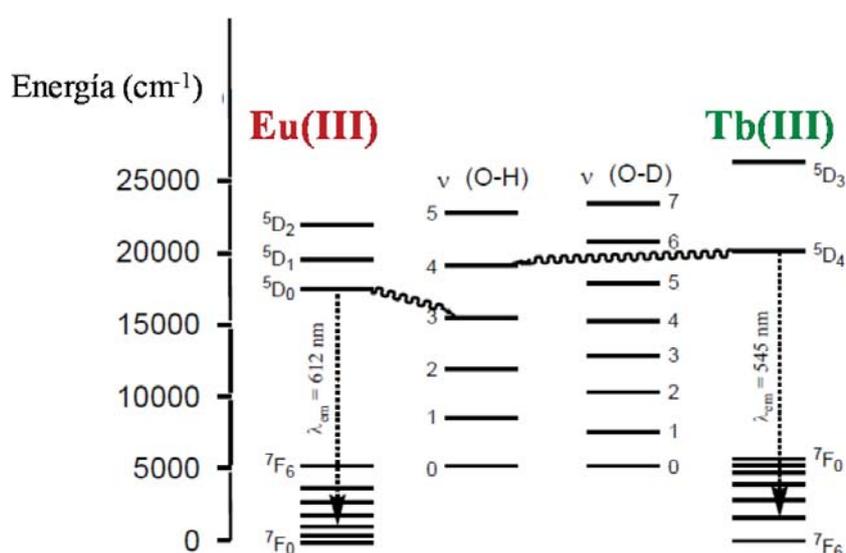


Figura 7.11. Diagrama de niveles energéticos del Eu(III) y del Tb(III) junto con los niveles vibracionales del H₂O y el D₂O. (La línea discontinua indica la relajación radiativa y la línea ondulada indica la transferencia energética que lleva a la relajación no radiativa).

Cuando se produce la excitación de los complejos de Eu(III) y Tb(III) en H₂O, parte de la energía se puede transmitir desde el estado excitado ⁵D₀ en el caso del Eu(III) y ⁵D₄ para el Tb(III) a los niveles vibracionales O-H pertenecientes a las moléculas de agua coordinadas, lo que produce una disminución de los tiempos de vida del estado excitado. Sin embargo, cuando los complejos son disueltos en D₂O, la transferencia

de energía no tiene lugar y los valores de los tiempos de vida no se ven afectados. A partir de estas diferencias es posible calcular el número de moléculas de agua que se encuentran coordinadas directamente al Ln(III) según las ecuaciones 3 y 4 para el Eu(III) y el Tb(III) respectivamente.¹⁷

$$q_{Eu(III)} = \frac{1}{2} \left[\left(\frac{1}{\tau_{H_2O}} - \frac{1}{\tau_{D_2O}} \right) - 0.25 \right] \quad (\text{ec.3})$$

$$q_{Tb(III)} = 5 \left[\left(\frac{1}{\tau_{H_2O}} - \frac{1}{\tau_{D_2O}} \right) - 0.06 \right] \quad (\text{ec.4})$$

Se llevaron a cabo las medidas de los tiempos de vida media para conocer el valor de q de los sistemas híbridos. Los experimentos se realizaron variando las condiciones de pH y además se llevaron a cabo las medidas en ausencia y en presencia de una disolución de cloruro sódico al 0.9% ya que el NaCl es un conocido desactivador de la emisión de fluorescencia. En la tabla 7.3 se recogen los resultados, a modo de ejemplo, del complejo B-Ln(III)-DO3A.

Los resultados son consistentes con la presencia de dos moléculas de agua coordinadas al Gd(III) en el sistema B-Gd(III)-DO3A¹⁶. Se realizaron los mismos estudios para el sistema B-Ln(III)-DTPA dando como resultado una molécula de agua en el sistema B-Gd(III)-DTPA¹⁸ en las condiciones de trabajo utilizadas. Además, la adición de un 0.9% de NaCl a las disoluciones no produce ningún cambio significativo en la emisión de fluorescencia de las muestras ni en el valor de q , lo que indica que el complejo se mantiene estable y no se produce la disociación del mismo.

Tabla 7.3. Valores de tiempos de relajación en H₂O y D₂O medidos a pH 2 y 5.5 en ausencia y en presencia de 0.9 % de NaCl para los sistemas B-Eu(III)-DO3A y B-Tb(III)-DO3A.

	τ (H ₂ O) (ms)	τ (D ₂ O) (ms)	q
Eu-pH 2	0.42	1.01	1.34
	0.47 ^{a)}	1.49	1.45
Eu-pH 2 + NaCl	0.38	1.36	1.97
Eu-pH 5.5	0.35	1.25	2.17
	0.35 ^{b)}	1.26	2.18
Eu-pH 5.5 + NaCl	0.37	1.12	1.87
Tb-pH 2	0.85	1.24	1.55
Tb-pH 2 + NaCl	0.77	1.14	1.81
Tb-pH 5.5	0.82	1.24	1.76
Tb-pH 5.5 + NaCl	0.86	1.30	1.67

a) medidas realizadas 3 h después de la preparación de las muestras y b) 2 semanas después.

7.2.2.2. Imágenes de resonancia magnética y cálculo de la relajatividad.

Para evaluar la eficacia de los complejos de Gd(III) de los sistemas híbridos, se obtuvieron imágenes de MRI del sistema B-Gd(III)-DO3A medidas en un campo de 63 MHz a 25 °C (figura 7.12). Para corroborar la estabilidad de los complejos, se realizaron las medidas variando el pH y la concentración de Gd(III). Para conocer la concentración de lantánido en las muestras se realizó espectrometría de masas (ICP-MS).

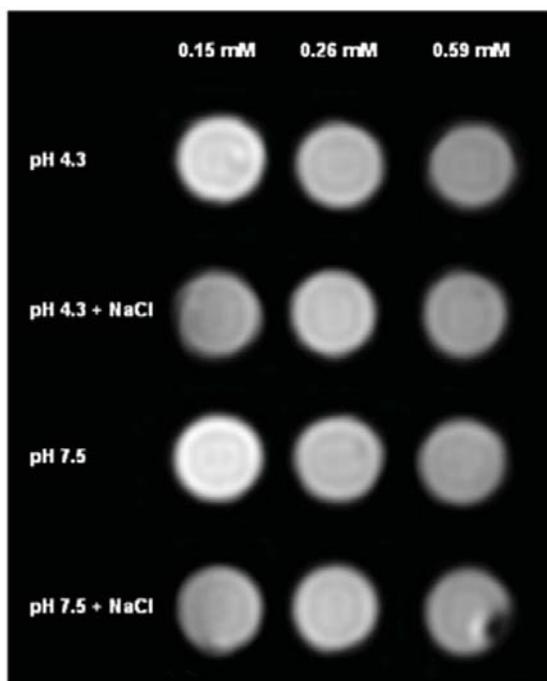


Figura 7.12. Mapa de T_1 del sistema B-Gd(III)-DO3A medido a 1.5 T a diferentes pHs en ausencia y en presencia de un 0.9% de NaCl a 25°C y un campo de 63MHz.

Los valores de relajatividad medidos a pH 4.3 y 7.5 son de $1.75 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $1.49 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ respectivamente. Se repitieron las medidas en presencia de 0.9% de NaCl dando valores de $1.33 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $1.32 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ (tabla 7.4). Los resultados indican una dinámica de intercambio lenta en las condiciones de trabajo estudiadas. Sin embargo, cuando las medidas se realizan a pH 2, la relajatividad aumenta de manera considerable hasta valores de $11.71 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$. Se podría pensar que este aumento es debido a la liberación del Gd(III) a la disolución, sin embargo a este pH, el valor de q obtenido sigue siendo de 2. Debido a la composición de la superficie de la nanopartícula, este cambio en los valores de la relajatividad con el pH sugiere que el grado de protonación de los grupos OH juega un papel importante en el intercambio de moléculas de agua entre el Gd(III) y el medio.

Para comprobar la estabilidad de las muestras con el tiempo, se repitieron las medidas de relajatividad después de un mes (tabla 7.4). Sólo en el caso de las muestras que llevaban preparadas un mes a pH 2 se produjo la liberación del Gd(III) del complejo al medio acuoso con el correspondiente aumento del valor de relajatividad.

Tabla 7.4. Valores de relajatividad para el sistema B-Gd(III)-DO3A recién preparadas y después de un mes. El valor de q se indica entre paréntesis.

	r (mM ⁻¹ s ⁻¹) recién preparadas	r (mM ⁻¹ s ⁻¹) después de 1 mes
pH 2	11.71 (2)	14.95 (8)
pH 2 + 0.9 % NaCl	3.55 (2)	10.46 (8)
pH 4.3	1.75 (2)	1.63 (2)
pH 4.3 + 0.9 % NaCl	1.33 (2)	1.06 (2)
pH 7.5	1.49 (2)	1.04 (2)
pH 7.5 + 0.9 % NaCl	1.32 (2)	1.21 (2)

7.2.2.3. Perfiles de relajación magnética nuclear.

Para obtener más información sobre el proceso de intercambio de moléculas de agua entre el complejo y el medio, se realizaron medidas de dispersión de relajación magnética nuclear (NMRD, por *nuclear magnetic relaxation dispersion*) sobre los sistemas B-Gd(III)-DO3A y B-Gd(III)-DTPA (figura 7.13) a 25 °C y 37 °C. Las medidas se realizaron suspendiendo las nanopartículas en disolución acuosa tamponada con HEPES (0.02 M) a pH 7.4 y en disolución acuosa tamponada conteniendo un 0.1% de surfactante.¹⁹

Es interesante destacar que no parece existir dependencia entre la relajatividad y la temperatura, en particular a valores de campo magnético altos, y que esta pequeña dependencia se cumple tanto para las muestras que tienen surfactante como para las que no. Sin embargo, como se puede ver en la figura 7.13, el sistema al que se ha añadido el surfactante muestra valores de relajatividad alrededor de 3 veces más altos que las muestra a la que no se le ha añadido, para todos los valores del campo magnético aplicado. Esta diferencia puede indicar cierto grado de agregación de las nanopartículas en agua pura.

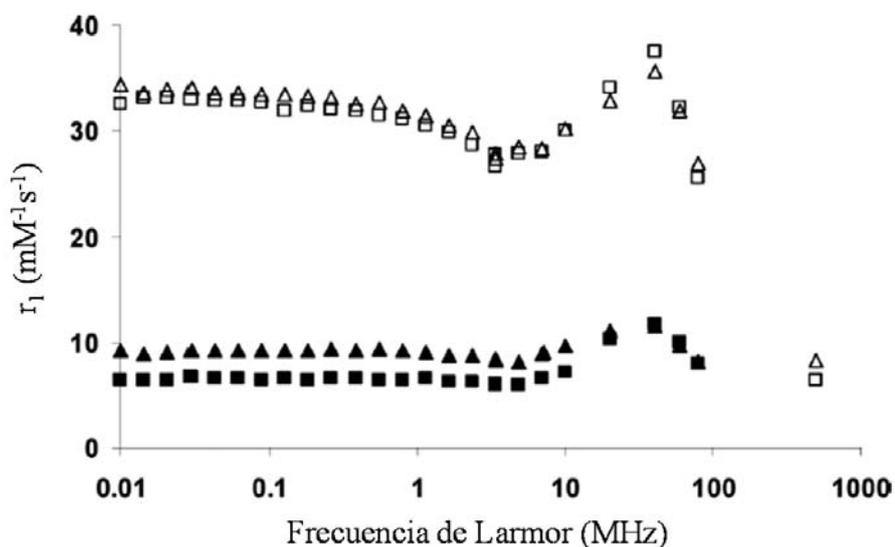


Figura 7.13. Perfiles de ¹H NMRD del sistema B-Gd(III)-DTPA a 25 °C (▲) y 37 °C (■) preparados en disolución acuosa (símbolos vacíos) y en disolución conteniendo un 0.1% de surfactante (símbolos rellenos), [Gd(III)] = 0.1 mM, pH = 7.4 (0.02 M HEPES).

Al comparar los valores de relajatividad obtenidos para los sistemas B-Gd(III)-DO3A y B-Gd(III)-DTPA no se encuentran muchas diferencias entre ellos a pesar que la molécula que coordina al Gd(III) es diferente (DO3A o DTPA) (figura 7.14). Además, los valores son inusualmente

bajos a pesar de que las curvas presentan la típica joroba a campos altos característicos de sistemas con una rotación lenta. Una explicación para este comportamiento podría ser la presencia de pequeños agregados en las dispersiones coloidales de los sistemas híbridos, incluso en presencia de surfactante. De este modo, existen complejos de Gd(III) que no contribuyen al valor de la relajatividad molar, ya que los átomos de Gd(III) no se encuentran accesibles a las moléculas de agua del medio, y por lo tanto se limita la relajatividad de los protones.

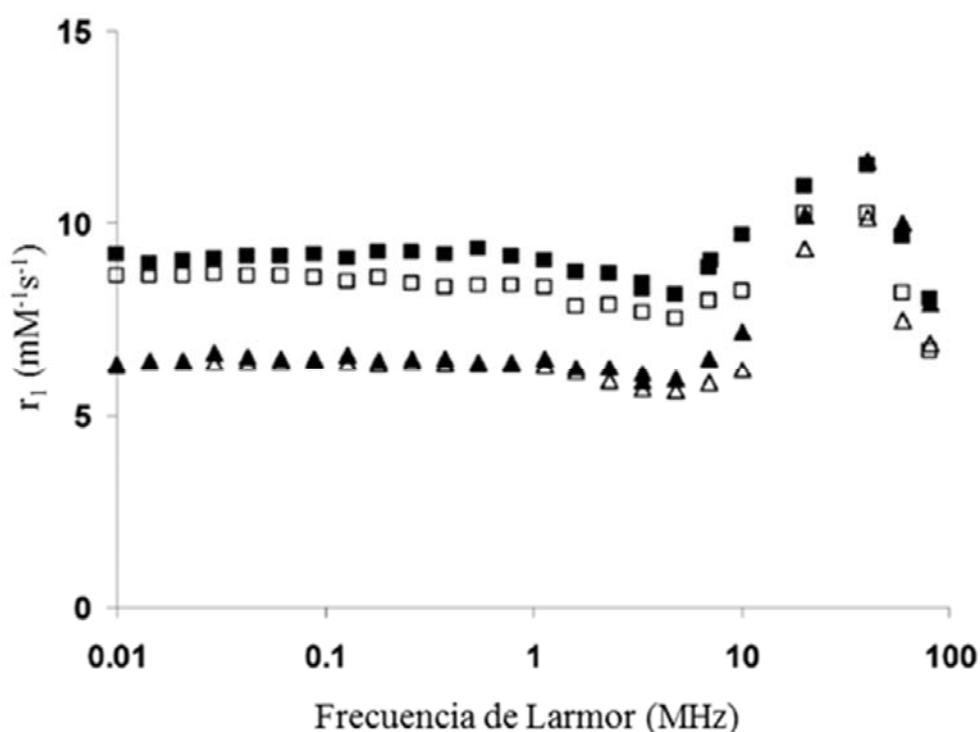


Figura 7.14. Perfiles de ^1H NMRD del sistema B-Gd(III)-DTPA (símbolos rellenos) y B-Gd(III)-DO3A (símbolos vacíos) en disolución acuosa conteniendo 0.1% de surfactante a 25 °C (■) y 37 °C (▲), $[\text{Gd(III)}] = 0.1 \text{ mM}$, $\text{pH} = 7.4$ (0.02 M HEPES).

7.2.2.4. Tiempos de relajación transversal mediante ^{17}O RMN.

Para obtener más información sobre la capacidad de intercambio de moléculas de agua en nuestros sistemas híbridos se han llevado a cabo medidas de velocidad de relajación transversal de ^{17}O RMN variando la temperatura. Se prepararon diferentes dispersiones de nanopartículas en disolución acuosa y como referencia se empleó disoluciones acuosas de Y(III) diamagnético preparadas en las mismas condiciones de concentración ($[\text{Ln(III)}] = 1 \text{ mM}$) y pH 7 que los sistemas híbridos. En la figura 7.15 se muestra las velocidades de relajación ($1/T_{2r}$) definidas según la ecuación 5 y 6.

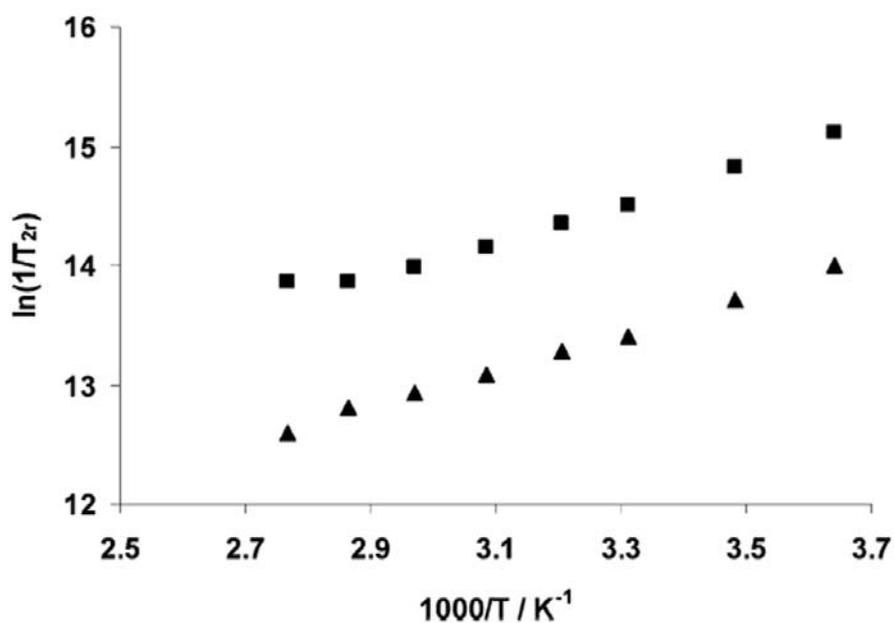


Figura 7.15. Velocidades de relajación transversal de ^{17}O de los sistemas B-Gd(III)-DO3A (\blacktriangle) B-Gd(III)-DTPA (\blacksquare).

$$\frac{1}{T_{2r}} = \left(\frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_{2ref}} \right) / P_m \quad (\text{ec. 5})$$

$$P_m = [Gd(III)] * \frac{q}{55.5} \quad (\text{ec. 6})$$

siendo T_2 y T_{2r} los tiempos de relajación transversal experimentales del complejo de Gd(III) y de la disolución de referencia respectivamente. P_m representa la fracción molar de la molécula de agua coordinada y se ha asumido para los cálculos que $q = 2$ para el sistema B-Gd(III)-DO3A y $q = 1$ para B-Gd(III)-DTPA.

En ambos sistemas se produce una disminución de las velocidades de relajación conforme aumenta la temperatura, lo que es una clara indicación de que se produce un intercambio rápido de agua. Hay que tener en cuenta que por la presencia de pequeños agregados, existe una proporción de complejos de Gd(III) que no tienen acceso a las moléculas de agua y que no contribuyen a las velocidades de relajación que se están midiendo. Sin embargo, esta proporción podría verse modificada en función de la temperatura. La complejidad del sistema impide un análisis sencillo de los datos y del cálculo de la constante de velocidad de intercambio exacta.

A pesar de todo, el perfil de la curva de $1/T_{2r}$ representa una clara evidencia de que los complejos de Gd(III) que se encuentran en la superficie de las nanopartículas tienen una velocidad de intercambio rápida, y lo que es más importante, los valores obtenidos son considerablemente mayores que los correspondientes complejos en su forma libre. De hecho, los complejos de GdDO3A²⁰ y GdDTPA²¹ muestran un régimen de intercambio intermedio y lento respectivamente cuando se representa el término $1/T_{2r}$ frente a la inversa de la temperatura. Una de las

razones que podrían explicar el intercambio rápido de moléculas de agua que se está observando sería la presencia de los grupos OH en la superficie de las nanopartículas que de alguna manera están favoreciendo el proceso de intercambio, por lo que es necesario realizar estudios adicionales para corroborar esta hipótesis.

7.2.3. Caracterización de los complejos de Eu(III) y Tb(III) como sondas luminiscentes.

7.2.3.1. Microscopía confocal de imagen.

Las propiedades ópticas de las sales de Eu(III) y Tb(III) así como las de sus complejos de coordinación han permitido su uso en diversas aplicaciones biomédicas como los inmunoensayos, la detección de proteínas, la visualización de células, etc.²² Debido a ello, se decidió evaluar los sistemas híbridos complejados con Eu(III) y Tb(III) como agentes de contraste de imagen para su uso en aplicaciones *in vivo*.

Se incubaron células HeLa humanas con una dispersión de nanopartículas funcionalizadas con concentraciones entre 50 y 100 μM de lantánido variando el tiempo de incubación de 30 min, a 4 horas y 1 día. Después de 4 horas se observó que las nanopartículas se encontraban en el interior de las células (figura 7.16).

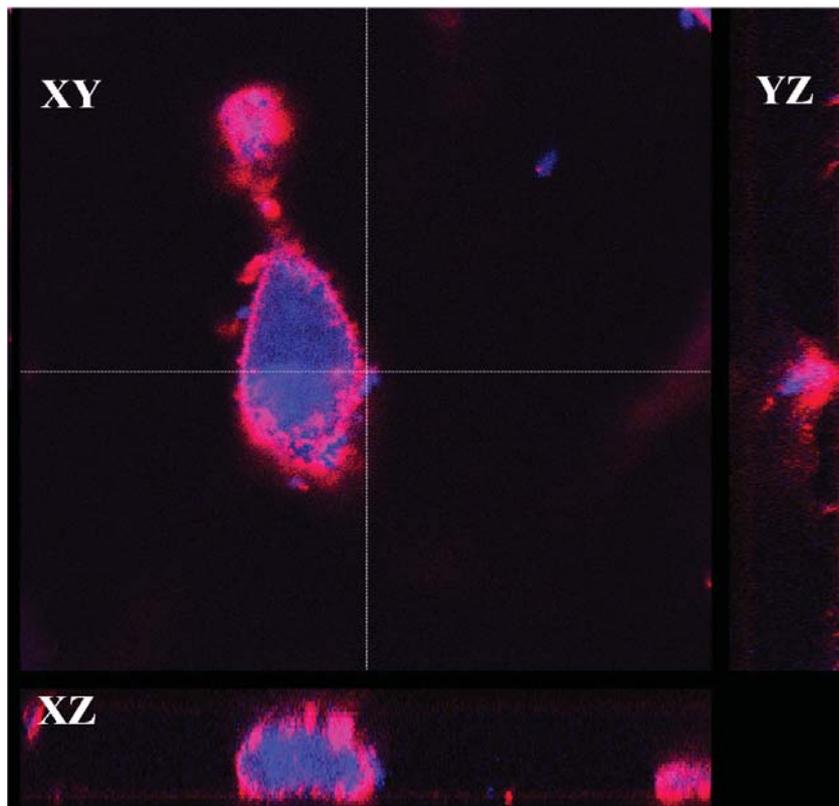
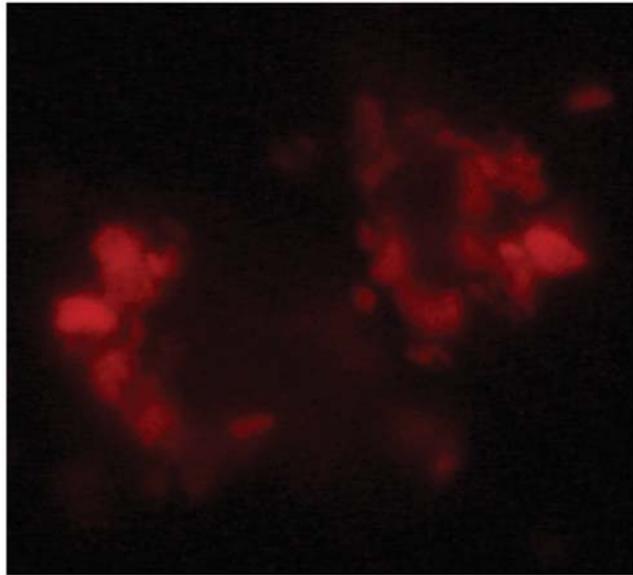


Figura 7.16. Microscopía de fluorescencia confocal de células HeLa incubadas con el sistema B-Tb-DO3A. Rojo: CD44, azul: sistema híbrido.

En la imagen se puede ver diferentes planos de una célula en la que las nanopartículas se encuentran distribuidas en el citoplasma y aparentemente no están dentro de vesículas. Se utilizó el anticuerpo CD44 para comprobar la incorporación de los sistemas híbridos a las nanopartículas. Además, el tiempo empleado tanto para la incubación de las nanopartículas con las células, así como el tiempo empleado en llevar a cabo los experimentos no provocaron ningún tipo de toxicidad celular (figura 7.17).

B-Eu(III)-DO3A



B-Tb(III)-DO3A

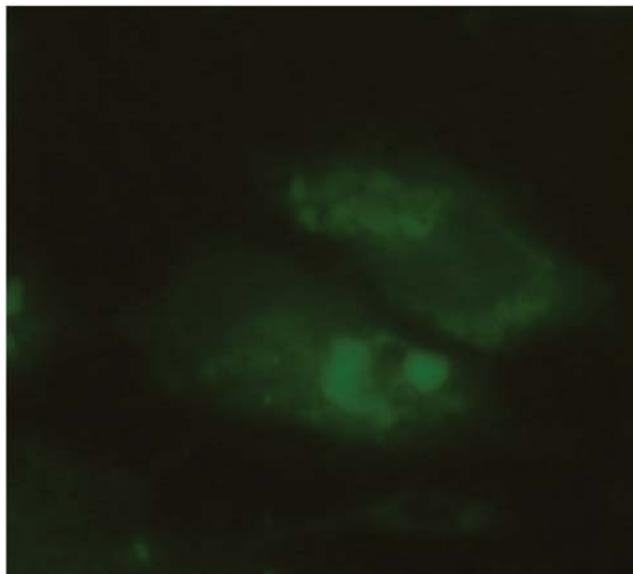


Figura 7.17. Céluls HeLa incubadas con B-Ln(III)-DO3A durante 1 día,
[Ln(III)] = 100 μ M.

7.2.3.2. Citometría de flujo.

Para comprobar la toxicidad de los sistemas híbridos en los cultivos celulares se realizaron estudios por citometría de flujo. Esta técnica permite distinguir entre células apoptóticas (muerte celular programada provocada por ella misma) y necróticas (muerte celular provocada por un agente externo nocivo) de una manera rápida y eficaz.

Los cultivos celulares fueron incubados con los sistemas híbridos en las mismas condiciones que las empleadas en la microscopía celular (100 μ M y 4 horas). Los resultados se muestran en la figura 7.18 (para el sistema B-Ln(III)-DO3A) y 7.19 (para el sistema B-Ln(III)-DTPA), donde se pueden diferenciar 4 zonas o cuadrantes: Q1 para células necróticas; Q2 para células apoptóticas tardías; Q3 para células apoptóticas tempranas; y Q4 para células vivas.

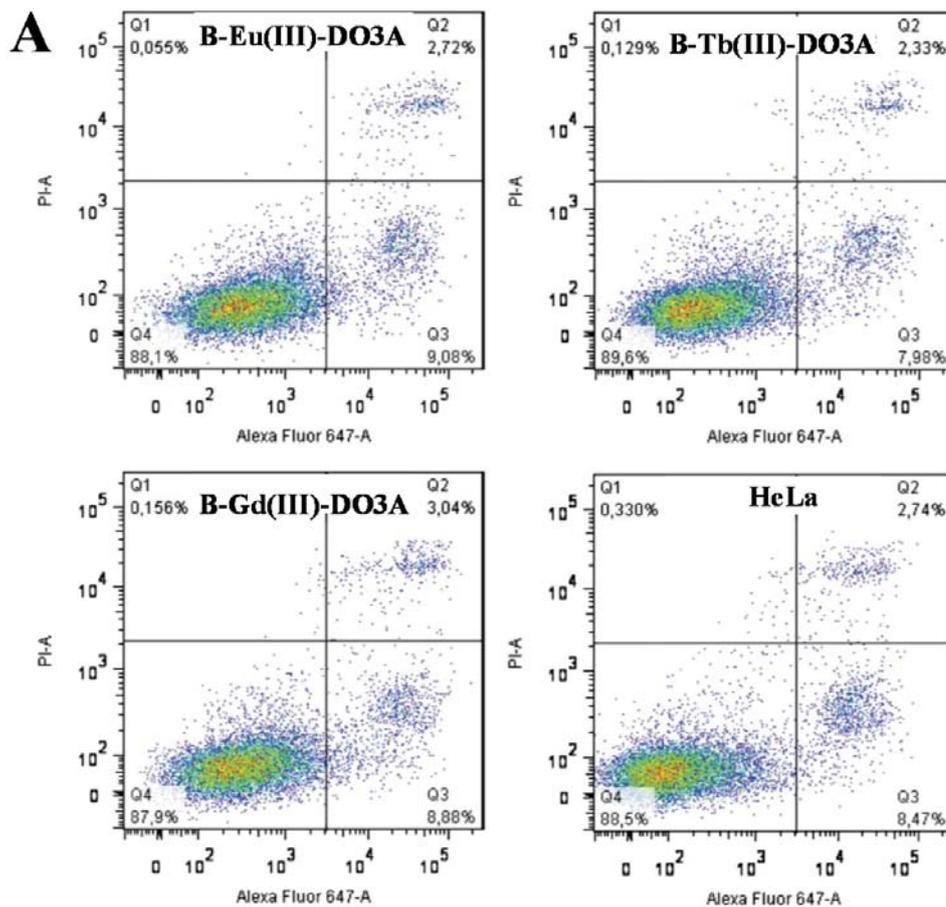


Figura 7.18. Citometría de flujo realizada sobre células HeLa con el sistema híbrido B-Ln(III)-DO3A. Como indicadores se ha empleado yoduro de propidio frente a Annexin-V Alexa Fluor 647.

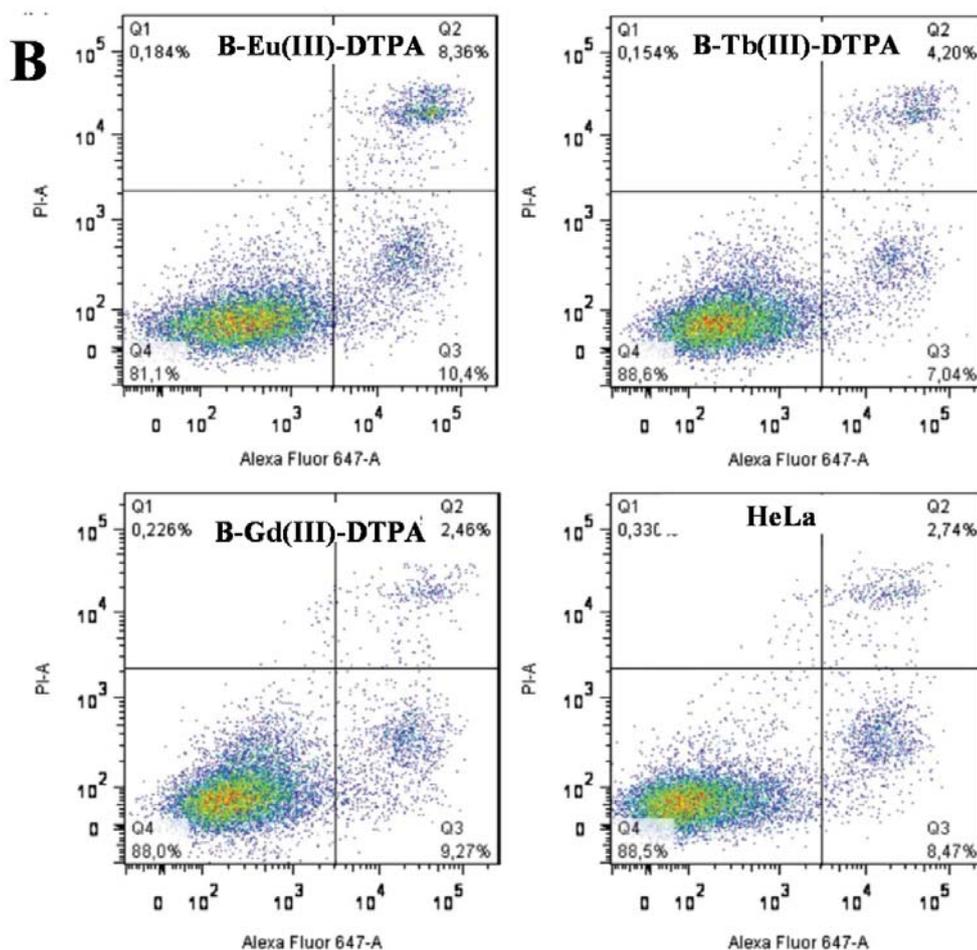


Figura 7.19. Citometría de flujo realizada sobre células HeLa con el sistema híbrido B-Ln(III)-DTPA. Como indicadores se ha empleado yoduro de propidio frente a Annexin-V Alexa Fluor 647.

Los resultados muestran que tanto las nanopartículas de bohemita como las nanopartículas funcionalizadas no son tóxicas ya que la mayor parte de ellas se encuentran en el cuadrante Q4 correspondiente a las células vivas. Se ha encontrado que más del 86 % de las células eran viables, sin importar el tipo de quelato empleado (DTPA o DO3A).

7.3. Conclusiones.

Se han preparado y caracterizado en detalle dos nuevos sistemas híbridos formados por la unión de dos moléculas orgánicas: DO3A y DTPA a la superficie de nanopartículas de bohemita. Además se han formado los complejos de Eu(III), Tb(III) y Gd(III).

Se han evaluado los complejos de Gd(III) como posibles agentes de contraste. La elevada cantidad de cationes por nanopartícula ofrece una magnificación de la señal de MRI que puede resultar muy útil para la visualización de pequeñas estructuras como el caso de células. El número de moléculas de agua unidas al Gd(III) ha sido el esperado para estas moléculas, y se han obtenido velocidades de intercambio de agua mayores que las correspondientes a los complejos aislados. Además, se ha encontrado que la rotación de los complejos se ha ralentizado debido a la fijación de los complejos orgánicos en la superficie de las nanopartículas.

A pesar de los buenos resultados obtenidos en los parámetros q , τ_M y τ_R , las medidas de relajatividad realizadas a pH fisiológico no han resultado ser tan buenas como se esperaba debido quizá, a la aparición de pequeños agregados en las dispersiones de las nanopartículas, que impiden el acceso del medio a los complejos de Gd(III) localizados en el interior del agregado. Estos resultados parecen indicar que la presencia de grupos OH en la superficie tiene un papel importante en el valor de relajatividad, por lo que se necesitarían hacer más estudios en este punto.

Además se han evaluado las propiedades ópticas de los complejos de Eu(III) y Tb(III) en células humanas HeLa. Los resultados obtenidos son muy prometedores en cuanto al uso de este tipo de sistemas híbridos

como sondas biológicas, ya que las células han incorporado a las nanopartículas en su interior sin que exista ningún tipo de toxicidad.

7.4. Bibliografía.

- [1] A. E. Merbach, E. Toth (eds.), *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*, John Wiley & Sons, Ltd., New York, 2001.
- [2] M. A. Brown, R. C. Semelka, *MRI: Basic Principles and Applications*, Wiley-Liss, 1995.
- [3] V. Jacques, J. F. Desreux, *Top. Curr. Chem.*, 2002, 221 (Contrast Agents I), 123.
- [4] a) M. A. Perazella, *Curr. Drug Saf.*, 2008, 3, 67. b) G. Burnstock, *Pharmacol. Rev.*, 2006, 58. c) C. Corot, J. M. Idee, A. M. Hentsch, R. Santus, C. Mallet, V. Goulas, B. Bonnemain, D. Meyer, *J. Magn. Reson. Imaging*, 1998, 8, 695.
- [5] E. Strandberg, P.-O. Westlund, *J. Magn. Reson. Ser. A*, 1996, 122, 179.
- [6] H. Kobayashi, T. Saga, S. Kawamoto, N. Sato, A. Hiraga, T. Ishimori, J. Konishi, K. Togashi, M. W. Brechbiel, *Cancer Res.*, 2001, 61, 4966.
- [7] A. Datta, K. N. Raymond, *Acc Chem Res.*, 2009, 42, 938.
- [8] J.-C. G. Bunzli, *Chem. Lett.*, 2009, 38, 104.
- [9] a) J.-C. G. Bunzli, C. Piguet, *Chem. Soc. Rev.*, 2005, 34, 1048. b) E. G. Moore, A. P. S. Samuel, K. N. Raymond, *Acc. Chem. Res.*, 2009, 42, 542.
- [10] a) D. Parker, J. A. G. Williams, *Metal Ions In Biological Systems - The Lanthanides and Their Interrelations with Biosystems*, Vol. 40 (Eds.: H. Sigel, A. Sigel, Marcel Dekker, New York, 2003. b) R. S. Dickins, D. Parker, J. I. Bruce, D. J. Tozer, *Dalton Trans.* 2003, 1264.

[11] S. A. Cotton, *Lanthanides and Actinides Chemistry*, John Wiley & Sons, 2006.

[12] a) D. Zhu, F. Liu, L. Ma, D. Liu, Z. Wang, *Int. J. Mol. Sci.*, 2013, 14, 10591. b) K. Binnemans, *Chem. Rev.* 2009, 109, 4283. c) H. B. Na, I. C. Song, T. Hyeon, *Adv. Mater.*, 2009, 21, 2133. d) S. A. Wickline, A. M. Neubauer, P. M. Winter, S. D. Caruthers, G. M. Lanza, *J. Magn. Reson. Imaging*, 2007, 25, 667.

[13] C. Sun, J. S. H. Lee, M. Zhang, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2008, 60, 1252.

[14] a) P. Hermann, J. Kotek, V. Kubicek, I. Lukes, *Dalton Trans.*, 2088, 3027. b) E. Terreno, D. D. Castelli, A. Viale, S. Aime, *Chem. Rev.*, 2010, 110, 3019.

[15] P. Caravan, J. J. Ellison, T. J. McMurry, R. B. Lauffer, *Chem. Rev.*, 1999, 99, 2293

[16] a) J. I. Bruce, R. S. Dickins, L. J. Govenlock, T. Gunnlaugsson, S. Lopinski, M. P. Lowe, D. Parker, R. D. Peacock, J. J. B. Perry, S. Aime, M. Botta, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, 122, 9674. b) Y. Bretonniere, M. J. Cann, D. Parker, R. Slater, *Org. Biomol. Chem.*, 2004, 2, 1624.

[17] a) R. M. Supkowski, W. De Witt, W. D. Horrocks, *Inorg Chim Acta.*, 2002, 340, 44. b) A. Beeby, I. M. Clarkson, R. S. Dickins, S. Faulkner, D. Parker, L. Royle, A. S. de Sousa, J. A. G. Williams, M. Woods, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1999, 493. c) W. D. Horrocks, D. R. Sudnick, *J. Am. Chem. Soc.*, 1979, 101, 334.

[18] a) K. Hanaoka, K. Kikuchi, H. Kojima, Y. Urano, T. Nagano, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, 126, 12470. b) D. Parker, J. A. G. Williams, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1996, 3613. c) M. Li, P. R. Selvin, *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, 117, 8132.

[19] a) C. Platas-Iglesias, L. Vander Elst, W. Zhou, R. N. Muller, C. F. G. C. Geraldes, T. Maschmeyer, J. A. Peters, *Chem.–Eur. J.*, 2002, 8, 5121. b) G. A. Pereira, D. Ananias, J. Rocha, V. S. Amaral, R. N. Muller, L. Vander Elst, E. Tóth, J. A. Peters, C. F. G. C. Geraldes, *J. Mater. Chem.*, 2005, 15, 3832.

[20] E. Tóth, O. M. Ni Dhubhghaill, G. Besson, L. Helm, A. E. Merbach, *Magn. Reson. Chem.*, 1999, 37, 701.

[21] E. Tóth, L. Burai, E. Brücher, A. E. Merbach, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1997, 1587.

[22] a) Y. Junhua, D. Parker, R. Pal, R. A. Poole, M. J. Cann, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, 128, 2294. b) M. J. Lim, W. F. Patton, M. F. Lopez, K. H. Spofford, N. Shojaee, D. Shepro, *Anal. Biochem.*, 1997, 245, 184. c) Q. P. Qin, T. Lovgren, K. Pettersson, *Anal. Chem.*, 2001, 73, 1521. d) Z. Ye, M. Tan, G. Wang, J. Yuan, *J. Mater. Chem.*, 2004, 14, 851. e) X. Hai, M. Tan, G. Wang, Z. Ye, J. Yuan, K. Matsumoto, *Anal. Sci.*, 2004, 20, 245.

8.

**Nanopartículas de bohemita
modificadas para la detección
de sulfato en agua.**



8.1. Introducción.

El reconocimiento de aniones mediante el uso de receptores sintéticos ha sido y aún es hoy en día uno de los objetivos de la Química Supramolecular.¹ Este interés se fundamenta en la presencia de especies cargadas negativamente en muchas dianas biológicas, como por ejemplo los péptidos, nucleótidos, carbohidratos, etc.^{2,3} Sin embargo, la necesidad de un reconocimiento efectivo de aniones es útil además en el campo medioambiental debido a la existencia de especies radioactivas contaminantes como los pertecnetatos, especies tóxicas o problemáticas de alguna manera en los procesos de tratamientos de aguas, como los sulfatos, cromatos o incluso fosfatos por nombrar algunos.

Sin embargo, el desarrollo de receptores aniónicos fue más tardío respecto al de los catiónicos debido a las características particulares que exhiben los aniones frente a los cationes. Las especies aniónicas son relativamente grandes. Por ejemplo, los haluros tienen un tamaño mayor que sus correspondientes cationes isoelectrónicos. La diferente relación carga-radio (menor en el caso de los aniones) hace que la interacción electrostática sea menos efectiva en el caso del anión. Por otra parte, los aniones tienen energías de solvatación más altas que los cationes con la misma carga neta y tamaño comparable. La tabla 8.1 recoge diferentes propiedades para algunos aniones comunes.⁴

Tabla 8.1. Radio iónico, entalpías y energías libres de solvatación.

Anión	radio (ppm)	$-\Delta H_{\text{hydr}}$ (kJ mol ⁻¹)	$-\Delta G_{\text{hydr}}$ (kJ mol ⁻¹)
F ⁻	133	510	472
Cl ⁻	181	367	347
Br ⁻	196	336	321
I ⁻	220	291	283
SO ₄ ²⁻	230	1035	1090
H ₂ PO ₄ ⁻	200	522	473
NO ₃ ⁻	179	312	306

Aunque la carga y el tamaño de los aniones son muy importantes a la hora de diseñar un receptor adecuado, es necesario prestar especial atención a la forma del mismo. La afinidad de un receptor por un catión depende, entre otros factores, del número de coordinación del catión, de manera que el reconocimiento está favorecido si el número de coordinación del catión concuerda con la topología del receptor. En el caso de los aniones siempre se ha dicho que no existe el concepto de número de coordinación, y se ha hablado del tipo de geometrías que pueden exhibir los aniones (figura 8.1), de modo que a la hora de sintetizar los receptores, se ha buscado un alto grado de complementariedad topológica con los sustratos aniónicos que se quieren reconocer.⁵

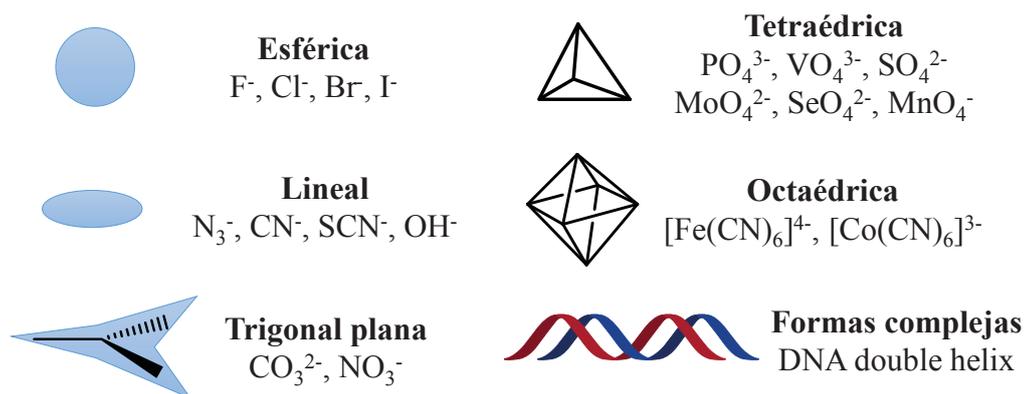


Figure 8.1. Variedad estructural presente en los aniones.

Gracias al esfuerzo realizado en el desarrollo del reconocimiento aniónico, en la última década se ha introducido el concepto de doble valencia para los aniones al igual que existe para los cationes.⁶ La primera valencia haría referencia a la carga del anión (equivalente a la carga del catión) y la segunda valencia (equivalente a la esfera de coordinación) estaría representada por los enlaces de hidrógeno formados con un “ligando”.

Otro aspecto a tener en cuenta en el reconocimiento aniónico es la solvatación. Como se ha comentado anteriormente, los aniones poseen energías de solvatación elevadas, especialmente en disolventes hidroxílicos y en agua, por lo que muchos de los estudios que se han realizado en este campo han utilizado disolventes apolares, evitando el uso de disolventes acuosos.⁵ En agua, los aniones tienen una alta capacidad de formar enlaces de hidrógeno, por lo que los receptores deben establecer interacciones fuertes de cara a competir de una manera altamente eficaz con las moléculas de agua que están situadas en la esfera de solvatación del anión. Además, la mayoría de los aniones son sensibles al pH (pierden parcial o totalmente la carga negativa a valores de pH bajos al captar

protones). Este hecho obliga a que los receptores sean efectivos en la franja de pH en la cual el anión no está protonado.

8.1.1. Reconocimiento de sulfato.

El reconocimiento de sulfato y fosfato es uno de los objetivos más buscados hoy en día dentro del campo del reconocimiento aniónico y de este trabajo de investigación.⁷ El sulfato es una especie contaminante presente en los desechos nucleares que interfiere en los procesos de tratamiento de los mismos.² Además es conocido por ser uno de los responsables de la dureza del agua⁸. El anión fosfato se usa en la obtención de detergentes y es uno de los responsables de la eutrofización de ríos y lagos. Por otra parte, el anión fosfato junto con sus correspondientes ésteres y anhídridos tienen un papel importante en muchos procesos biológicos.

Debido a que el sulfato (SO_4^{2-}) y el fosfato (PO_4^{3-}) son oxoaniones isoelectrónicos e isoestructurales, el reconocimiento de uno de ellos en presencia del otro no es algo sencillo. Ambos aniones son de tipo hidrofílico, lo que hace pensar que los centros de reconocimiento hidrofílicos serán más efectivos que los centros hidrofóbicos. La hidrofilia aniónica está relacionada con la serie de Hofmeister (figura 8.2).⁹ Franz Hofmeister estableció esta clasificación en 1888 a partir del estudio de precipitación de proteínas causada por ciertas sales. En esta serie existen aniones fuertemente solvatados, como el fluoruro o el sulfato que son capaces de disminuir la solubilidad de una proteína, mientras que aniones como perclorato o el tiocianato muestran un efecto contrario. La serie de Hofmeister ha sido asociada históricamente con la habilidad de los iones de modular la red de enlaces de hidrógeno del agua. Según ese principio,

aniones como el sulfato y el fosfato son de tipo cosmotrópico o “*structure making*”, lo que significa que interaccionan fuertemente con las moléculas de agua. Estas interacciones son incluso más fuertes que las presentes entre las propias moléculas de agua, lo que hace que esta clase de aniones pueda romper enlaces de hidrógeno entre ellas.

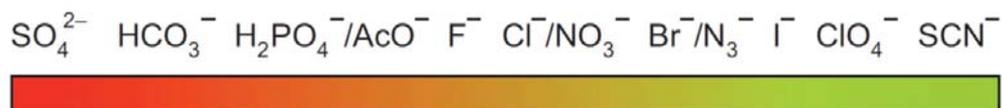


Figura 8.2. Típica representación de la serie de Hofmeister para una serie de aniones inorgánicos.

Aunque esta clasificación aún se puede encontrar en la literatura, es necesario tener en cuenta que las propiedades de los iones en disolución acuosa y sus interacciones con moléculas orgánicas son significativamente más complejas.¹⁰

La mayor diferencia que se puede encontrar entre sulfato y fosfato es quizás su basicidad, lo que permite diferenciarlos por su carga neta a ciertos pHs. En la figura 8.3 se muestran los diagramas de distribución de especies para ambos aniones. A pH fisiológico el anión sulfato se encuentran totalmente desprotonados mientras que el anión fosfato se encuentra como una mezcla al 50% de la forma monoprotonada y la diprotonada. La forma completamente desprotonada del fosfato sólo se puede encontrar cuando el pH es elevado.

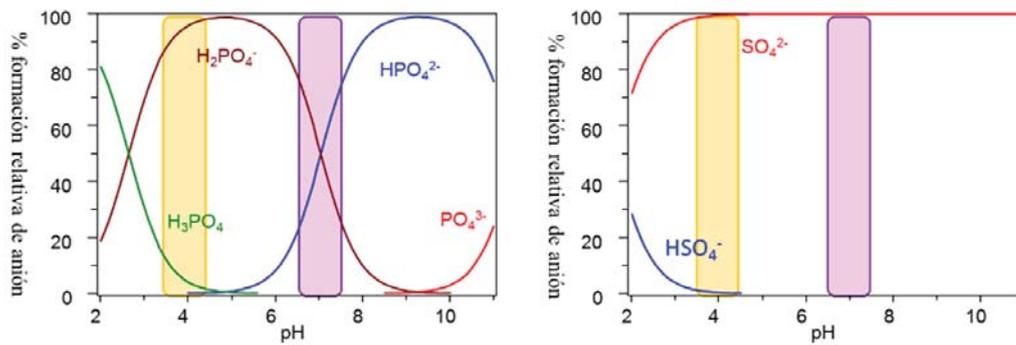


Figura 8.3. Diagramas de distribución determinados a $298.1 \pm 0.1\text{K}$ en NaCl 0.15 mol.dm^{-3} .

Los sistemas biológicos hacen uso de los diferentes pK_a de estos aniones para conseguir un reconocimiento selectivo de ellos. Un ejemplo claro se encuentra en las proteínas de unión de sulfato (SBP) y fosfato (PBP) presentes en bacterias (figura 8.4).¹¹

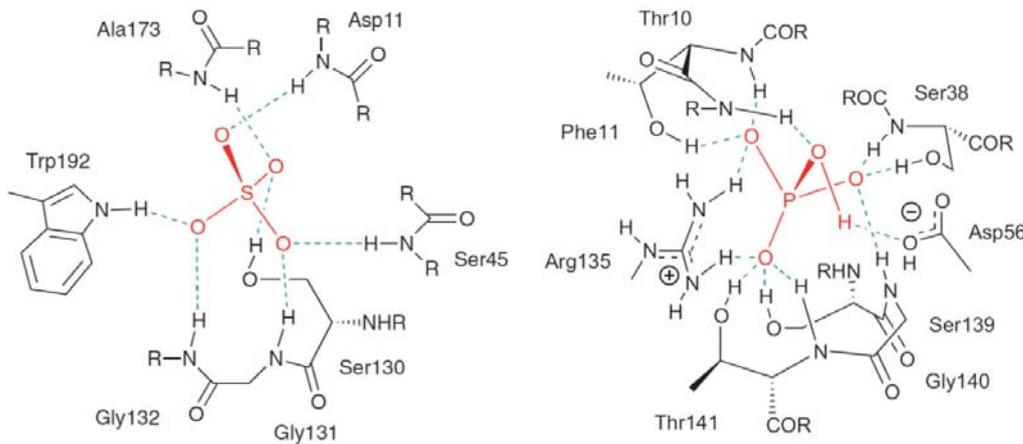


Figura 8.4. Representación esquemática de las interacciones presentes entre el sulfato (izquierda) y el hidrogenofosfato (derecha) con los centros activos de las correspondientes proteínas transportadoras. (SPB: code 1SPB y PBP: code 1IXH).

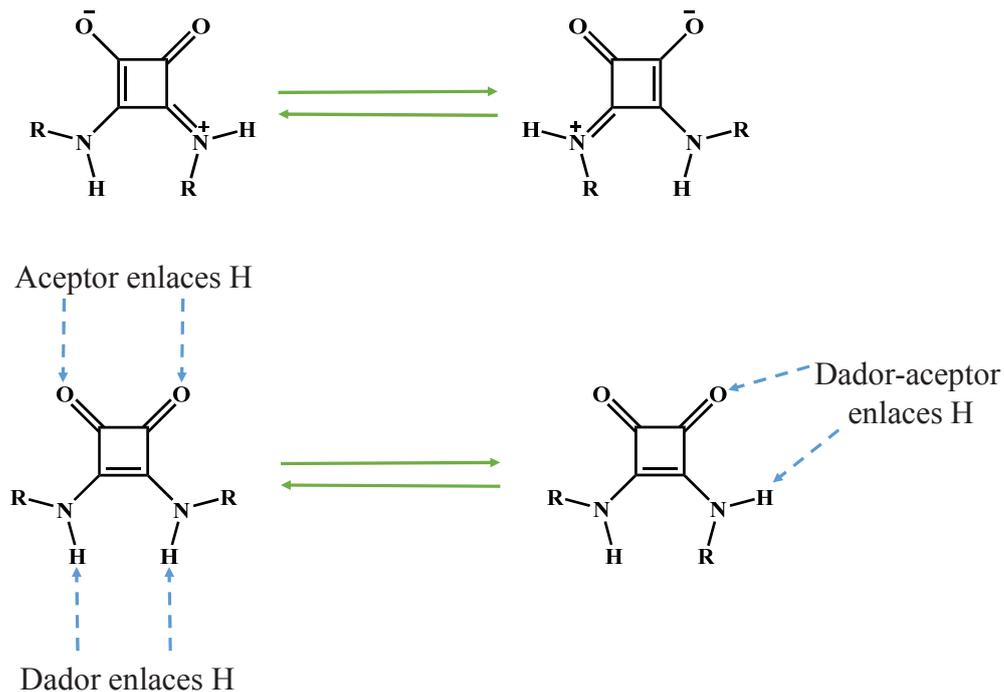
Ambas proteínas son responsables del transporte de los respectivos aniones a través del espacio periplásmico una vez han pasado la membrana externa de la célula por transporte pasivo. Mientras que la unión entre el

sulfato y el centro activo de la proteína se lleva a cabo sólo a través de enlace de hidrógeno dadores, el hidrógeno presente en el HPO_4^{2-} puede formar un enlace de hidrógeno dador extra con el centro activo de la PBP. Esta característica diferencial se puede utilizar también en los receptores aniónicos sintéticos para lograr un reconocimiento selectivo de una especie frente a otra introduciendo elementos discriminadores de carga en el diseño del receptor.

8.1.2. Unidades escuaramida para el reconocimiento aniónico.

Si nos centramos en el reconocimiento aniónico en disolventes polares, el diseño de receptores se ha basado en la síntesis de moléculas que presentan un gran número de cargas positivas. En este sentido, la carga puede ser introducida de varias maneras: o bien se pueden emplear ligandos que al pH de trabajo tengan múltiples cargas positivas, de manera que favorezcan las interacciones electrostáticas con el anión, o se puede favorecer este tipo de interacciones mediante la introducción de un catión, siendo el complejo metálico el responsable del reconocimiento. Sin embargo, además de las interacciones electrostáticas, existen otro tipo de fuerzas no covalentes a través de las cuales puede alcanzarse una unión con el sustrato de manera muy eficaz como son las interacciones hidrófobas, las fuerzas de van der Waals, las interacciones de tipo π y por último los enlaces de hidrógeno.

En este sentido, el grupo escuaramida se puede considerar, como unidad independiente, como la amida derivada del ácido escuárico. Si se pone especial atención a su estructura, esta molécula puede actuar como dador y aceptor de enlaces de hidrógeno (esquema 8.1).

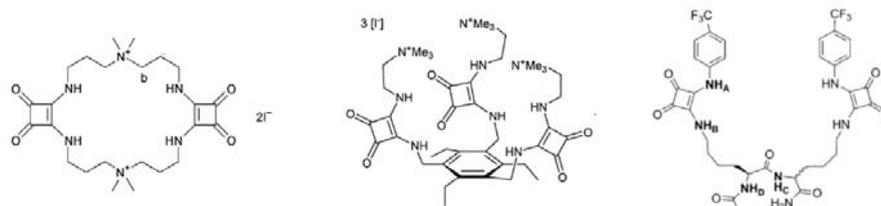


Esquema 8.1. Equilibrio de las conformaciones de la unidad escuaramida y sus formas de resonancia zwitterionica.

La formación de enlaces de hidrógeno incrementa el carácter aromático de la molécula de la que forma parte. Además, si los enlaces de hidrógeno ocurren en los grupos carbonilo, se produce una polarización en la escuaramida que incrementa la carga parcial positiva sobre los N-Hs de manera que se aumenta su capacidad de grupo dador. Este tipo de amidas son capaces de transmitir los efectos electrónicos a través de todo su sistema de enlaces conjugados, lo que permite una deslocalización del par de electrones solitario del nitrógeno en el anillo de cuatro miembros, obteniéndose así las formas de resonancia zwitteriónicas que se ven en el esquema 8.1. Estas características estructurales son las responsables de la alta capacidad que tienen las escuaramidas para formar puentes de hidrógeno.¹² La rotación del enlace C-N se encuentra restringido y como consecuencia, con una unidad de ciclobutenodiona como esqueleto rígido,

los dos hidrógenos que forman parte de la amida se encuentran orientados a lo largo del plano de esta unidad y pueden participar en el reconocimiento aniónico a través de enlaces de hidrógeno.

En las últimas décadas, se ha empezado a trabajar con moléculas neutras como receptores aniónicos, utilizando enlaces de hidrógeno como principal fuerza de unión entre el receptor y el sustrato.¹³ Sin embargo, para que estos receptores puedan llevar a cabo un reconocimiento eficaz, los estudios se han tenido que realizar en medios apolares o en mezclas de disolventes orgánicos con un bajo porcentaje de agua.¹⁴ En el esquema 8.2 se muestran varios ligandos que contienen unidades de escuaramida. En los dos primeros ha sido necesario el uso de metanol y mezclas de agua:etanol para llevar a cabo los estudios, mientras que en el último caso se han realizado en DMSO. Por lo tanto aún es necesario un mayor avance en la síntesis de receptores escuaramídicos capaces de reconocer aniones en agua pura.

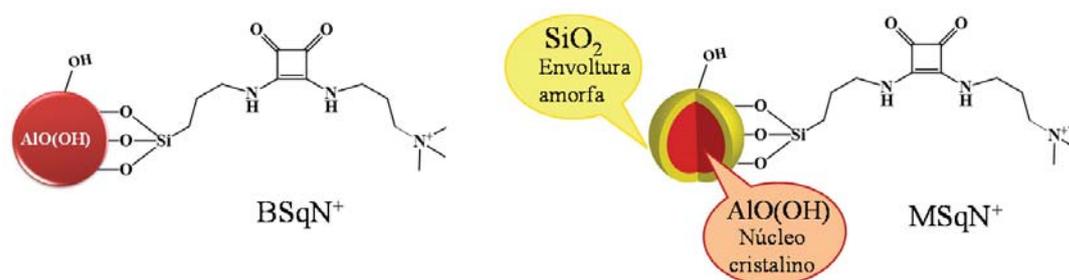


Chem. Commun., 2001, 1456 J. Org. Chem., 2006, 71, 7185 Chem. Eur. J., 2014, 20, 7373

Esquema 8.2. Estructuras orgánicas de diferentes ligandos escuaramídicos para el reconocimiento aniónico.

8.2. Receptores híbridos.

En el esquema 8.3 se muestra la estructura de los materiales híbridos utilizados en este trabajo. La síntesis se ha llevado a cabo en colaboración con el grupo de Química Supramolecular de la Universidad de las Islas Baleares. En primer lugar se han preparado los sistemas BSqN⁺ y MSqN⁺. Esto dos sistemas se diferencian en el tipo de nanopartículas empleadas. En el caso de la BSqN⁺, las nanopartículas están formadas por AlO(OH) cristalino (bohemita) (B), mientras que en el caso de la MSqN⁺, el soporte inorgánico tiene una arquitectura de núcleo-envoltura de composición bohemita-sílica amorfa (M). Se ha cambiado el soporte para poder estudiar por un lado si hay cambios en la etapa de funcionalización y por otro, conocer si la naturaleza química de la superficie puede afectar al proceso de detección de los sustratos.



Esquema 8.3. Estructura de los materiales híbridos BSqN⁺ y MSqN⁺ sintetizados.

Una vez se llevó a cabo este estudio, las nanopartículas se funcionalizaron con diferentes tipos de moléculas para poder realizar un estudio del tipo de fuerzas que son predominantes en dicha detección. Para ello, se ha variado el número de unidades escuaramídicas (Sq) y el tipo de carga presente, ya sea una carga positiva que proviene de una amina cuaternizada (N⁺), o de una amina primaria protonada (NH₃⁺). A partir de

datos bibliográficos, se ha decidido utilizar yoduro como contraion debido a que la formación de pares iónicos en disolventes próticos es prácticamente despreciable en el intervalo de concentraciones usadas en este trabajo (10^{-6} - 10^{-3}) M.¹⁵

A diferencia de los estudios que se presentan en esta tesis doctoral, los materiales híbridos que se han sintetizado no contienen ningún fluoróforo por lo que la señalización del reconocimiento se ha llevado a cabo mediante un ensayo de desplazamiento colorimétrico.

8.3. Selección del indicador cromogénico.

Después de realizar una revisión de los posibles indicadores, se decidió utilizar un indicador ácido-base conocido como es el verde de bromocresol (VB) que cumple de manera satisfactoria los requisitos elegidos:

- Absorción. Es recomendable que presente una elevada intensidad de absorción en la zona ultravioleta-visible con preferencia hacia el visible.
- Solubilidad. Debe ser soluble en el medio acuoso tamponado en el que se quiere hacer las medidas.
- Carácter ácido-base. Un punto a tener en cuenta es el intervalo de pH en el que indicador tiene su viraje, ya que como se ha comentado anteriormente los aniones sulfato y fosfato presentan una carga diferente en función del pH del medio. En este sentido y dado que uno de los objetivos de este trabajo es el

reconocimiento selectivo de sulfato, se ha decidido elegir un indicador que presente su viraje a pHs ácidos.

- Constante de asociación. Se ha comprobado que los receptores basados en unidades escuaramídicas presentan una elevada constante de asociación frente a grupos carboxilato, sulfonato y análogos, por lo que es recomendable que el indicador tenga alguno de estos grupos para asegurar la interacción receptor-indicador.
- Control de pH. El hecho de trabajar en disolución acuosa hace necesario un control riguroso del pH para asegurarse que los cambios que se observan se deben a un proceso de reconocimiento del sustrato. Además, el hecho de trabajar en un medio tamponado sirve para el control de la fuerza iónica, lo que es importante cuando se trabaja con aniones en medios acuosos.

En la figura 8.1 se muestra la estructura y el equilibrio ácido-base del VB. Este indicador tiene un intervalo de viraje de 3.8 a 5.4 en agua pura. El indicador tiene un grupo sulfonato y un grupo fenólico que van a ser los mayores responsables tanto de la interacción con el grupo escuaramida, como del cambio de color de amarillo a azul.

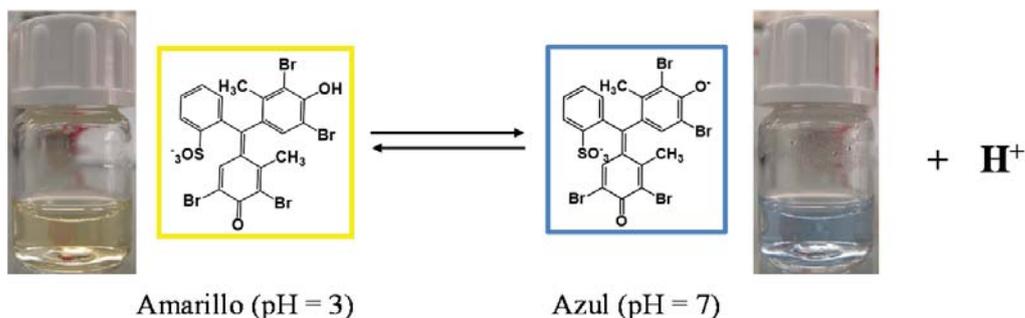


Figura 8.1. Equilibrio ácido base del VB y cambios de color que se observan.

Inicialmente se registraron los espectros ultravioleta-visible (UV-vis) de las dos formas del indicador que participan en el proceso. El VB en su forma ácida presenta una coloración amarilla con una banda de absorción centrada a 436 nm. La desprotonación de la unidad fenólica del VB para dar la forma básica dianiónica azul, con estructura de semiquinona con conjugación extendida, presenta un máximo de absorción a 616 nm. A la hora de elegir el pH de trabajo se registraron los espectros de absorción del indicador para varios valores de pHs (figura 8.2). Para llevar a cabo las medidas, se escogió un pH = 3.4 ya que es próximo a su intervalo de viraje y además, presenta la forma ácida amarilla de manera predominante sobre la forma básica de color azul.

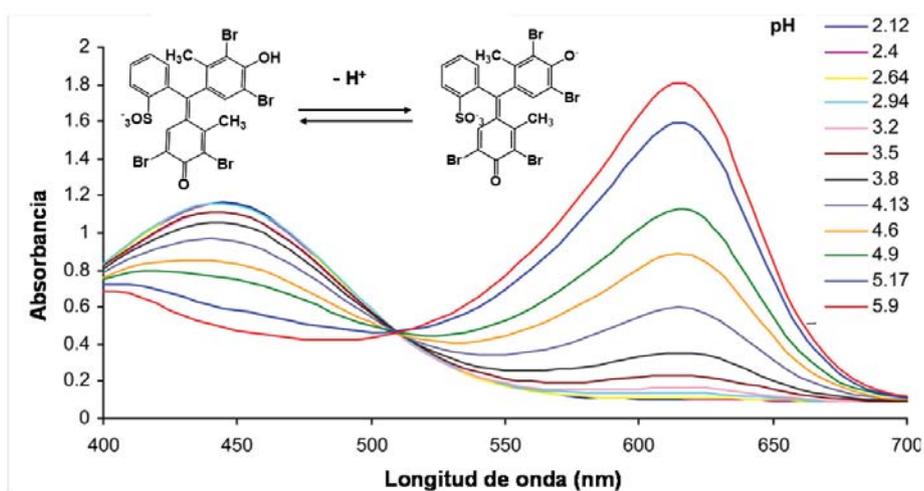


Figura 8.2. Espectro de absorción del VB a diferentes pHs.

8.4. Interacción de los materiales híbridos con el indicador verde de bromocresol.

A partir de la caracterización de los materiales híbridos se calculó el número de moléculas de receptor escuaramídico presente en la superficie

de las nanopartículas y a continuación, se comprobó si nuestros sistemas eran capaces de reconocer al indicador en disolución acuosa. En la figura 8.3 se puede ver, a modo de ejemplo, la variación del espectro UV-vis del indicador al añadir cantidades crecientes de una disolución coloidal de nanopartículas funcionalizadas. La adición del receptor híbrido provoca la disminución de la banda de absorción centrada a 436 nm propia de la forma ácida del VB y a la vez un aumento de la banda a 616 nm correspondiente a la forma básica (fenolato) del indicador. Se puede observar además, la presencia de un punto isobéptico situado a 506 nm, correspondiente a la presencia de dos formas activas que se encuentran en equilibrio. Dado que el sistema se encuentra tamponado, los cambios que se observan se deben atribuir a un proceso de complejación selectivo para la forma dianiónica del indicador que hace que se desplace el equilibrio hasta esta forma, lo que se traduce en un aumento de concentración y por lo tanto un aumento de su banda de absorción característica.

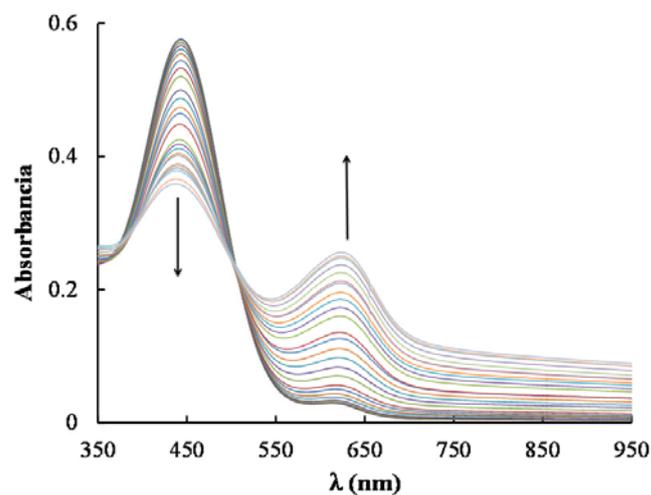


Figura 8.3. Espectro obtenido en la valoración de VB frente a cantidades crecientes de BSqN⁺.

Se realizó el mismo proceso para el sistema MSqN⁺. Dado que en estos dos sistemas la parte orgánica es la misma, se pueden comparar los resultados obtenidos para ver, si en efecto, la composición química de la superficie de las nanopartículas tiene algún efecto. En la figura 8.4 se ha representado el máximo de absorción de las dos formas del indicador en función de la cantidad de material híbrido añadido. En los dos sistemas se observa un reconocimiento del indicador aunque con pequeñas diferencias. La absorción de la forma ácida del VB disminuye para los dos sistemas, sin embargo, el aumento de la intensidad de la forma básica es menor en el caso de las nanopartículas de tipo núcleo-envoltura. Esto puede ser debido a que en estas últimas la superficie está compuesta por un material amorfo, que por una parte dificulta en cierta medida el proceso de funcionalización, y por otra, puede de alguna manera dificultar el acceso del indicador al receptor. Por ello, para el resto de sistemas híbridos sintetizados se escogió la bohemita como soporte.

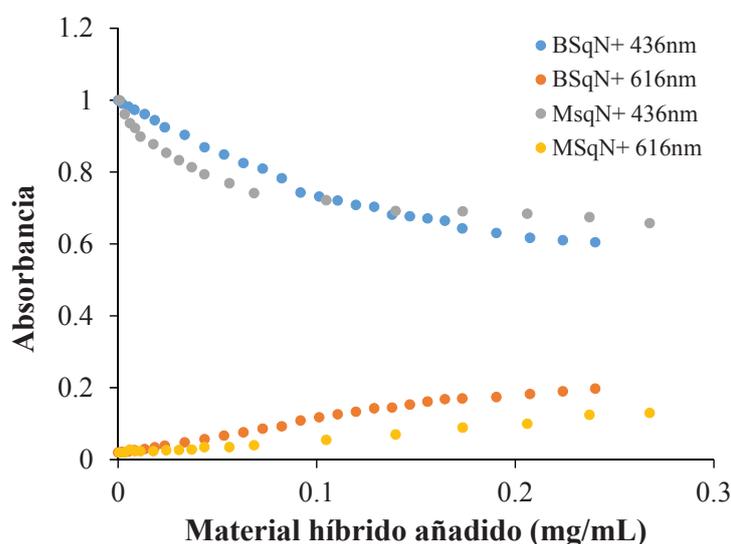
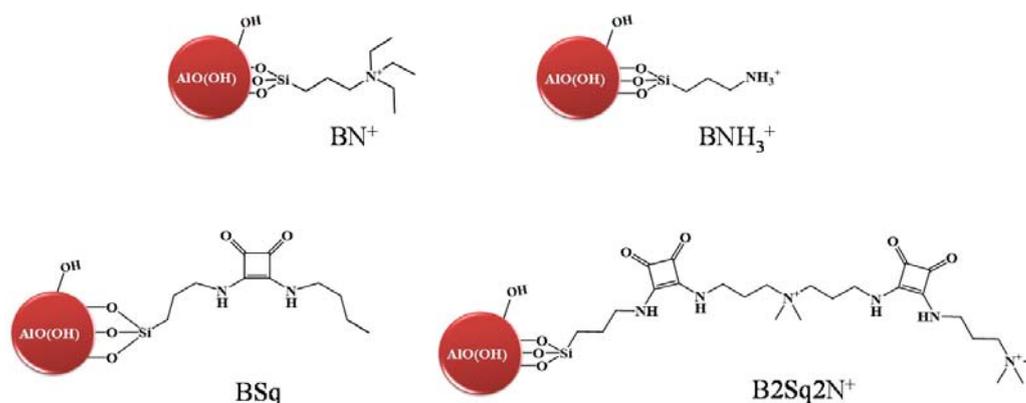


Figura 8.4. Cambios en la absorción del indicador al añadir cantidades crecientes de BSqN⁺ y MSqN⁺.

Si se presta un poco de atención a la molécula orgánica presente en el sistema BSqN⁺ se puede distinguir dos zonas posibles de interacción. Por una parte se encuentra la unidad escuaramídica y por otra parte un grupo amonio cuaternizado. Para estudiar un poco más el efecto de cada una de estas unidades en el reconocimiento aniónico se han sintetizado el resto de sistemas híbridos que se presentan en el esquema 8.4. Se ha sintetizado nanopartículas de bohemita que contienen un grupo amonio cuaternizado (BN⁺), un grupo escuaramida (BSq), una amina primaria protonada (BNH₃⁺) y por último un sistema doble de escuaramidas y amonios cuaternizados (B2Sq2N⁺) en su superficie. El primer paso para estudiar estos nuevos sistemas ha sido comprobar que son capaces de interaccionar con el indicador en las mismas condiciones experimentales que los sistemas BSqN⁺ y MSqN⁺.



Esquema 8.4. Estructura del resto de sistemas híbridos estudiados.

A excepción del sistema BN⁺, el resto de materiales híbridos muestran la misma tendencia de cambio en las bandas de absorción de la forma ácida y básica del indicador que los sistemas anteriores (figura 8.5). Además, también se ha encontrado un desplazamiento hipsocrómico mucho más marcado de la banda centrada a 444 nm, siendo máxima para

el sistema BSq (42 nm) y mínima (5 nm) para el sistema MSqN⁺. Este desplazamiento puede evidenciar la formación de un complejo que no lleva asociada una modificación de la estructura del cromóforo, es decir, además del equilibrio del sensor híbrido con la forma dianiónica del VB, en algunos sistemas se podría incluso encontrar un equilibrio con la forma monoaniónica del indicador.

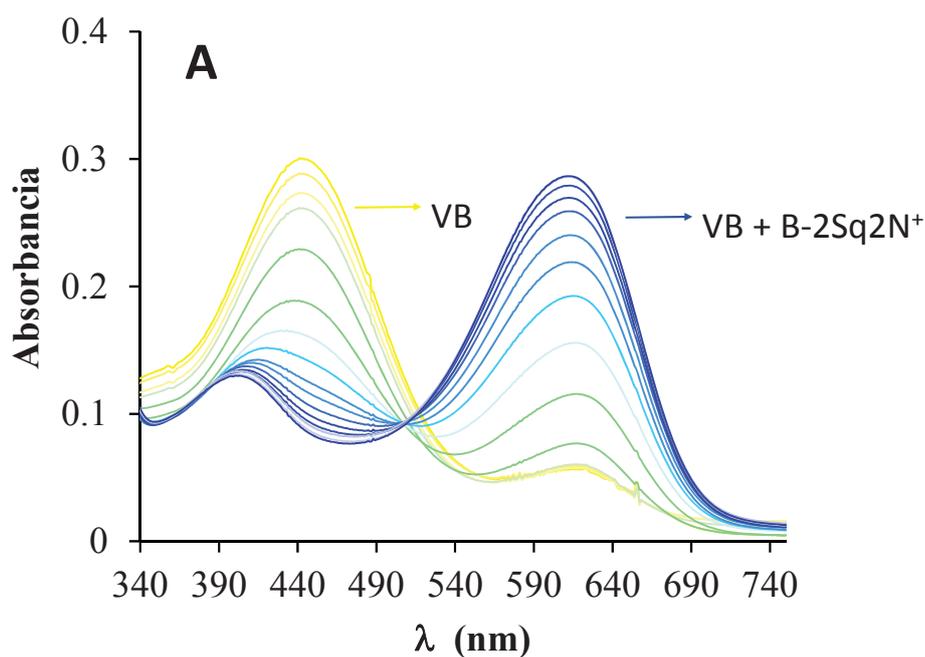


Figura 8.5. Interacción de los sistemas híbridos B2Sq2N⁺ (A).

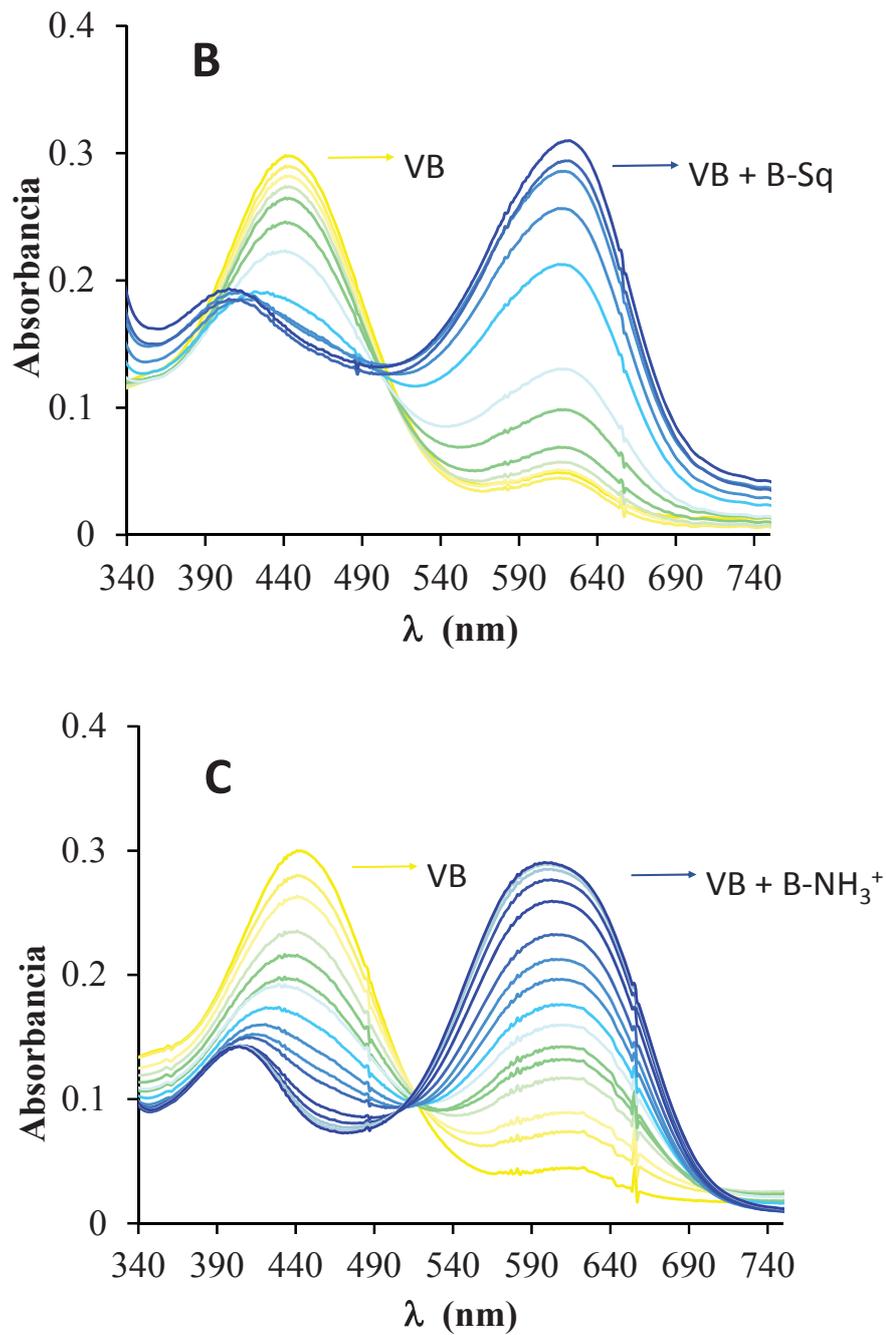


Figura 8.5. Interacción de los sistemas híbridos BSq (B) y BNH₃⁺ (C) con el VB.

Como se ha comentado anteriormente, cuando se realizó la valoración del indicador con el sistema BN^+ , éste no produjo cambios en el espectro de absorción del VB (figura 8.6) La adición de nanopartículas modificadas con grupos amonio cuaternario produjo los mismos efectos que la adición de nanopartículas sin funcionalizar como se aprecia visualmente en la figura 8.6. En ella se pueden ver disoluciones de indicador, de indicador más nanopartículas de bohemita sin funcionalizar, de indicador más el sistema BN^+ y por último, de indicador más el sistema B2Sq2NH_3^+ . En un principio cabría esperar que los sistemas BNH_3^+ y BN^+ mostraran los mismos resultados por el hecho de tener una carga positiva en ambos casos. Sin embargo, la posibilidad de formar puentes de hidrógeno por parte del sistema híbrido BNH_3^+ hace que al final, el comportamiento sea completamente diferente.

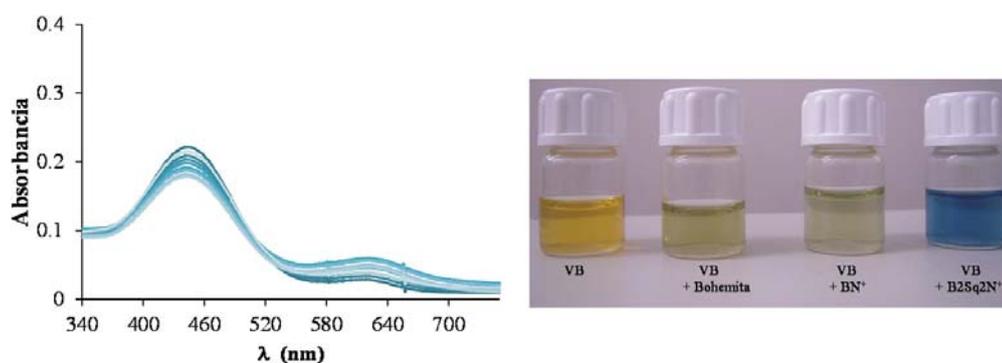


Figura 8.6. Valoración del VB con el sistema BN^+ (izquierda) e imagen de las disolución de indicador y de indicador más bohemita, BN^+ y B2Sq2NH_3^+ .

8.5. Experimentos de competición y determinación de las constantes de asociación.

Una vez seleccionadas las condiciones de trabajo, se realizaron una serie de experimentos de competición con diferentes aniones inorgánicos. En estos experimentos se mantuvo constante la concentración de nanopartículas funcionalizadas y de indicador y se fue incrementando la concentración de anión. En el caso de aniones con elevada afinidad por el receptor, la adición provoca un desplazamiento del VB complejado por el receptor y como consecuencia se produce un cambio en el espectro de absorción hacia la forma ácida del indicador, es decir, conforme el indicador deja de estar complejado, se observa un aumento de intensidad de la banda de absorción característica de la forma ácida y una disminución de la banda asignada a la forma básica del mismo. Macroscópicamente, el reconocimiento del anión presente en la disolución se observa por un cambio de coloración hacia el amarillo.

A continuación se muestran los resultados obtenidos para los ensayos de desplazamiento del sistema $BSqN^+$ con los aniones sulfato y cianuro (figura 8.7). Mientras que en la valoración realizada con aniones sulfato se puede observar una disminución de la intensidad de absorción de la forma básica y, un aumento de la forma ácida del indicador al ir añadiendo concentraciones crecientes de anión, no pasa lo mismo cuando la valoración se lleva a cabo con anión cianuro. Esto indica que el anión sulfato es capaz de coordinarse al receptor escuaramídico y desplazar a la forma básica del VB, mientras que el cianuro no.

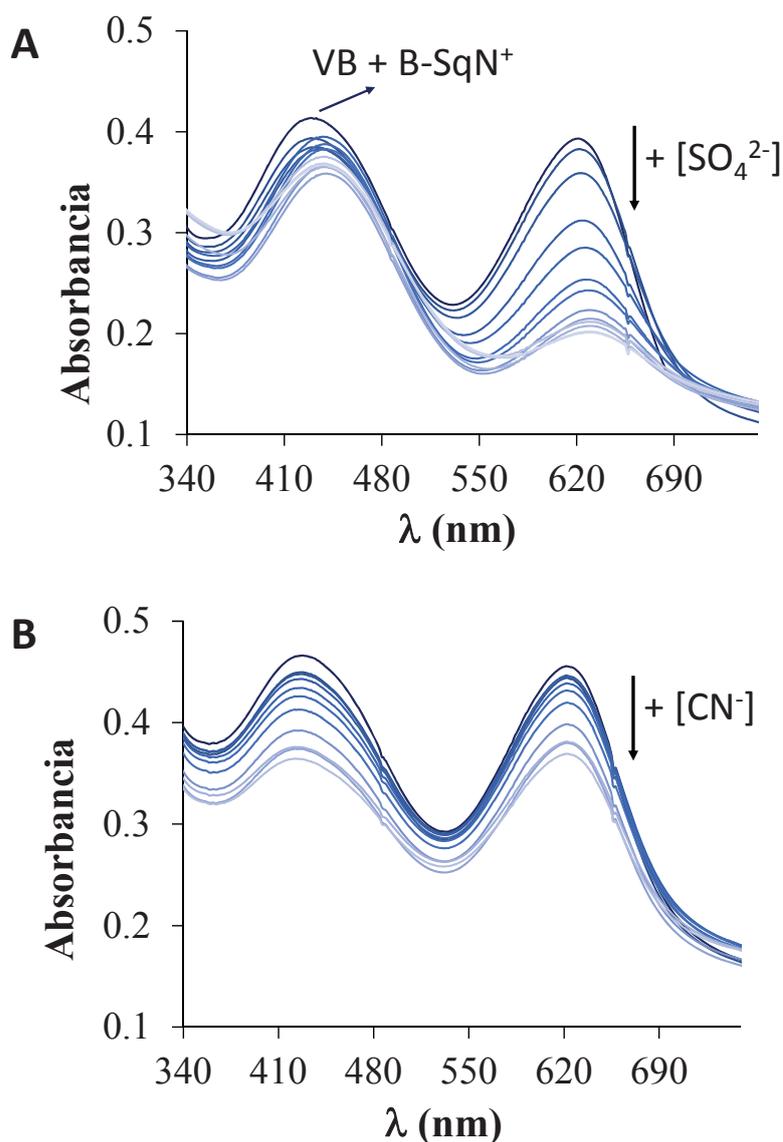


Figura 8.7. Ensayos de desplazamiento realizados sobre el sistema VB-BSqN⁺ y los aniones sulfato (A) y cianuro (B).

Los efectos en las valoraciones con el resto de aniones son muy parecidos por lo que para poder comparar los resultados obtenidos para todos los aniones de manera eficaz se ha representado la relación entre el máximo (pico) y el mínimo (valle) correspondiente a la forma básica del VB frente a la concentración de anión. Este tipo de representación permite comparar resultados evitando los errores debidos a los posibles efectos de

dilución de las muestras además de los desplazamientos de los máximos de absorción.¹⁶ En la figura 8.8 se muestran los resultados para el sistema BSqN⁺ y MSqN⁺. Como se puede observar en las gráficas, ninguno de los aniones monovalentes es capaz de desplazar al VB de nuevo a la disolución excepto el anión dihidrogenofosfato. El anión sulfato es el único que produce un importante descenso de la banda situada a 616 nm. Por lo tanto, se puede afirmar que se ha desarrollado un sensor híbrido capaz de seleccionar sulfato sobre fosfato de manera selectiva en las condiciones experimentales de trabajo.

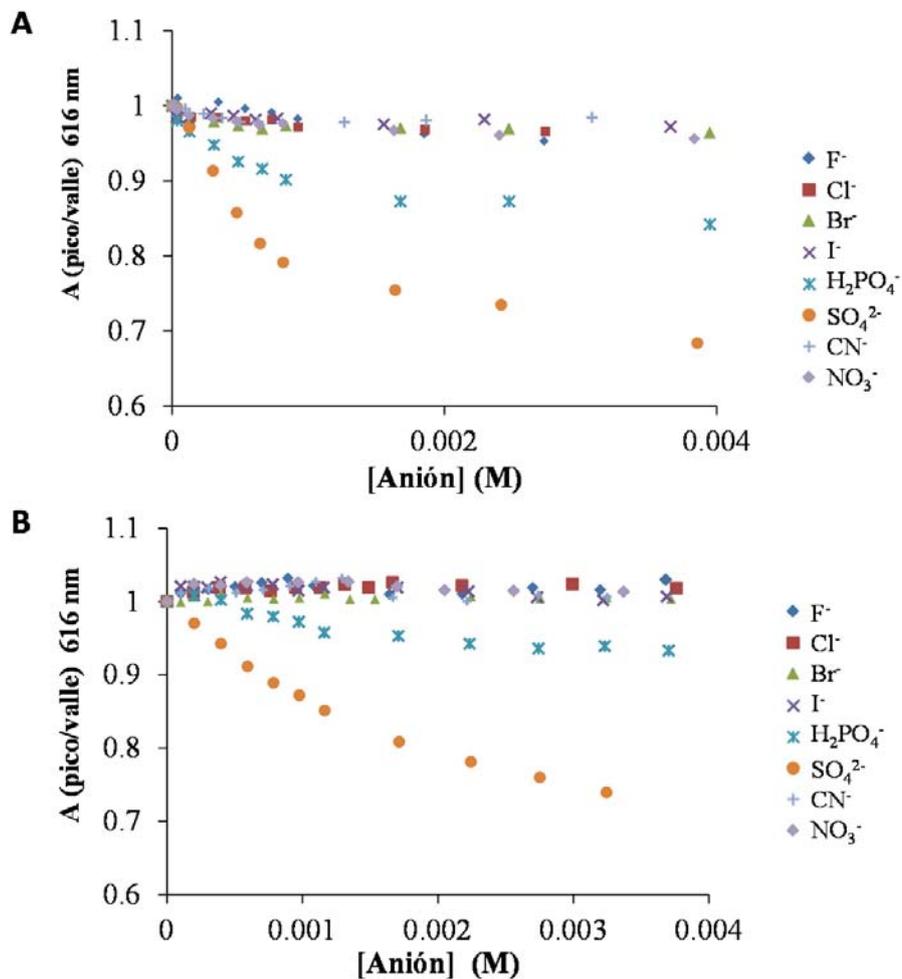


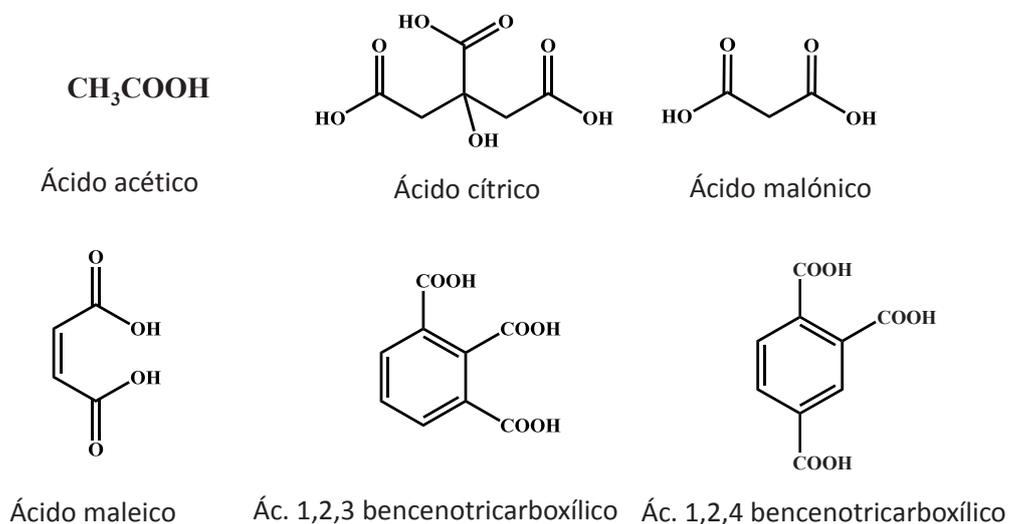
Figura 8.8. Cambios en los espectros de absorción del sistema VB-BSqN⁺ (A) y VB-MSqN⁺ (B) tras la adición de cantidades crecientes de diferentes aniones.

Aunque la tendencia es la misma para los dos sistemas, se pueden apreciar leves diferencias en la extensión o alcance del reconocimiento. A pesar de ser el mismo ligando escuaramídico, éste se encuentra localizado sobre nanopartículas cuya naturaleza es diferente ya que en el caso de BSqN⁺ la superficie está formada por gamma oxohidróxido de aluminio cristalino y en el caso del sistema MSqN⁺ la superficie es de sílica amorfa. Por ello, se puede concluir que las nanopartículas juegan un papel muy importante en el diseño de sensores híbridos y su función no se reduce únicamente a la de ser el soporte de las moléculas orgánicas.

A partir de los resultados obtenidos del análisis elemental se puede conocer la cantidad de materia orgánica anclada a la superficie de la bohemita, por lo que es posible estimar una constante de interacción entre el material híbrido y los aniones estudiados suponiendo una estequiometría 1:1 BSqN⁺:anión. La elección de esta estequiometría se deduce de trabajos anteriores en los que nanopartículas de bohemita se funcionalizaron con unidades antraceno.¹⁷ Cuando estos sistemas se estudiaron mediante espectroscopía de fluorescencia no se observó la formación de excímeros estáticos, lo que indica que las moléculas orgánicas están separadas cierta distancia unas de otras en la superficie sólida. Mediante el programa HYPERQUAD¹⁸ se pudieron determinar los logaritmos de las constantes de asociación para los aniones en los que se observaba reconocimiento obteniendo un $\log K = 4.89(2)$ para el anión sulfato y un $\log K = 3.33(1)$ para la interacción con dihidrogenofosfato (los valores entre paréntesis indican las desviaciones estándar en la última cifra significativa). El cociente entre estas dos constantes indica que el sistema BSqN⁺ tiene una selectividad de sulfato sobre dihidrogenofosfato de 30 veces. Este comportamiento se puede explicar teniendo en cuenta que la carga en el

fosfato y el sulfato es diferente a pH 3.4. Mientras que el sulfato es un dianión, el fosfato se presenta como monoanión. Sin embargo, queda por aclarar porque mientras el resto de aniones monovalentes no consigue desplazar al indicador del receptor híbrido, el dihidrogenofosfato sí lo consigue. Una posible explicación reside en la habilidad de este anión para actuar como dador de enlaces de hidrógeno.

Para evaluar la viabilidad de este procedimiento experimental, se realizaron ensayos complementarios de reconocimiento de ácidos dicarboxílicos y tricarboxílicos con el sistema BSqN⁺ (esquema 8.5).



Esquema 8.5. Estructura orgánica de los ácidos estudiados.

En la figura 8.9 se muestran los resultados obtenidos para los ácidos malónico (malo), maleico (mal), los isómeros de los ácidos 1,2,3- y 1,2,4-benceno tricarboxílicos (1,2,3-BTC y 1,2,4-BTC respectivamente), el ácido cítrico (CIT) y el ácido acético.

Como cabe esperar, el ácido acético no produce ningún cambio en la emisión de la forma básica del indicador, mientras que el ácido malónico

y maleico producen las mismas variaciones. Los ácidos tricarboxílicos son los que producen una mayor variación en el espectro UV-vis del VB.

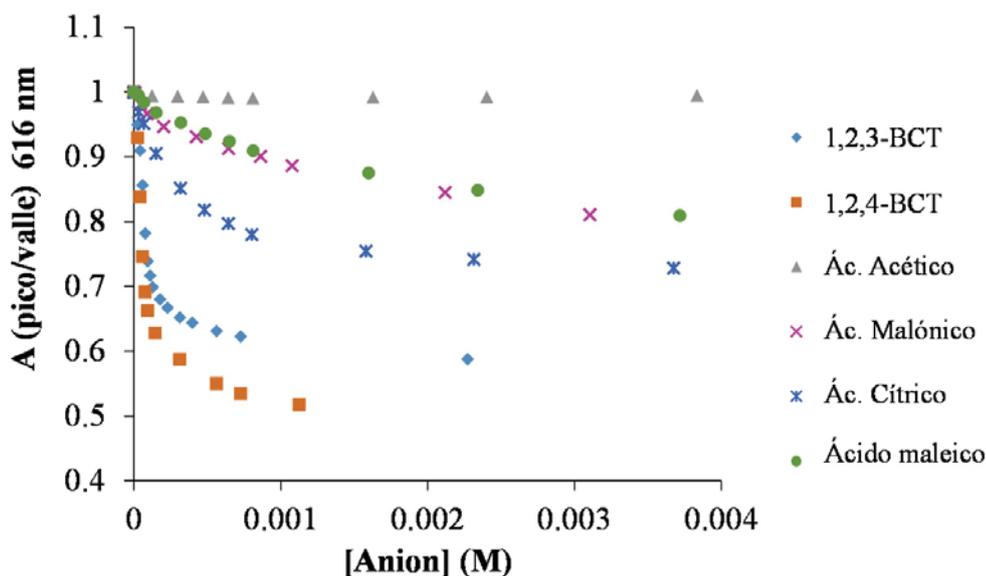


Figura 8.9. Cambios en los espectros de absorción del Sistema VB-BSqN⁺. Tras la adición de diferentes aniones carboxílicos.

En principio, se esperaría una correlación de los resultados con la carga neta de los sustratos al igual que sucedía en los experimentos anteriores. Sin embargo, cuando se calcula la carga neta de los aniones a partir de la tabla 8.2, nos encontramos con una situación diferente. A pH 3.4 todos los sustratos presentan carga -1 pero exhiben diferente respuesta en los ensayos de desplazamiento. Estos resultados hacen que sea necesario de nuevo tener en cuenta diversos aspectos como las energías de hidratación de los aniones, la capacidad de formar enlaces de hidrógeno o, en definitiva, el papel activo que las nanopartículas tienen en el proceso de detección aniónica.¹⁹

Tabla 8.2. Constantes de basicidad de varios de los aniones utilizados en este trabajo.

Reacción	Malo	Mal	CIT	1,2,3- BTC	1,2,4- BTC	H ₂ PO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻
H+ A ⇌ HA	5.36 ^a	5.86 ^a	5.44 ^b	5.40 ^b	5.51 ^c	11.74 ^a	1.55 ^a
H + HA ⇌ H ₂ A	2.52	1.71	4.17	3.90	4.06	6.71	
H + H ₂ A ⇌ H ₃ A			2.74	2.65	2.76	1.92	

a) Datos tomados de A. E. Martell, R. M. Motekaitis, NIST Critically Selected Stability Constants of Metal Complexes Database, NIST Standard Reference Database Version 4, 1997.

b) A. Bencini, A. Bianchi, M. I. Burguete, E. Garcia-España, S. V. Luis and J. A. Ramirez, J. Am. Chem. Soc., 1992, 114, 1919-1920.

8.6. Evolución de los sistemas híbridos.

En base a los resultados obtenidos, se decidió sintetizar una variedad de ligandos orgánicos en los que variaba el tipo y el número de puntos de unión. A continuación se discuten los resultados obtenidos para los ensayos de desplazamiento con los diferentes aniones estudiados. A diferencia de los anteriores sistemas, se puede observar una disminución de la intensidad de absorción de la forma básica y un aumento de la forma ácida del indicador en mayor o menor medida al ir añadiendo concentraciones crecientes de anión en todas las valoraciones, lo que indicaría que en todos los casos hay unión del anión al receptor escuaramídico desplazando al VB. Sin embargo no son los únicos cambios que se pueden observar en los espectros de absorción, ya que para aquellos sistemas en los que se produce un reconocimiento eficaz del anión estudiado, se observa una recuperación del máximo de absorción de la

forma ácida del indicador revirtiendo el desplazamiento hipsocrómico que se observaba en un principio. La figura 8.10 muestra las valoraciones realizadas para el sistema BSq a modo de ejemplo.

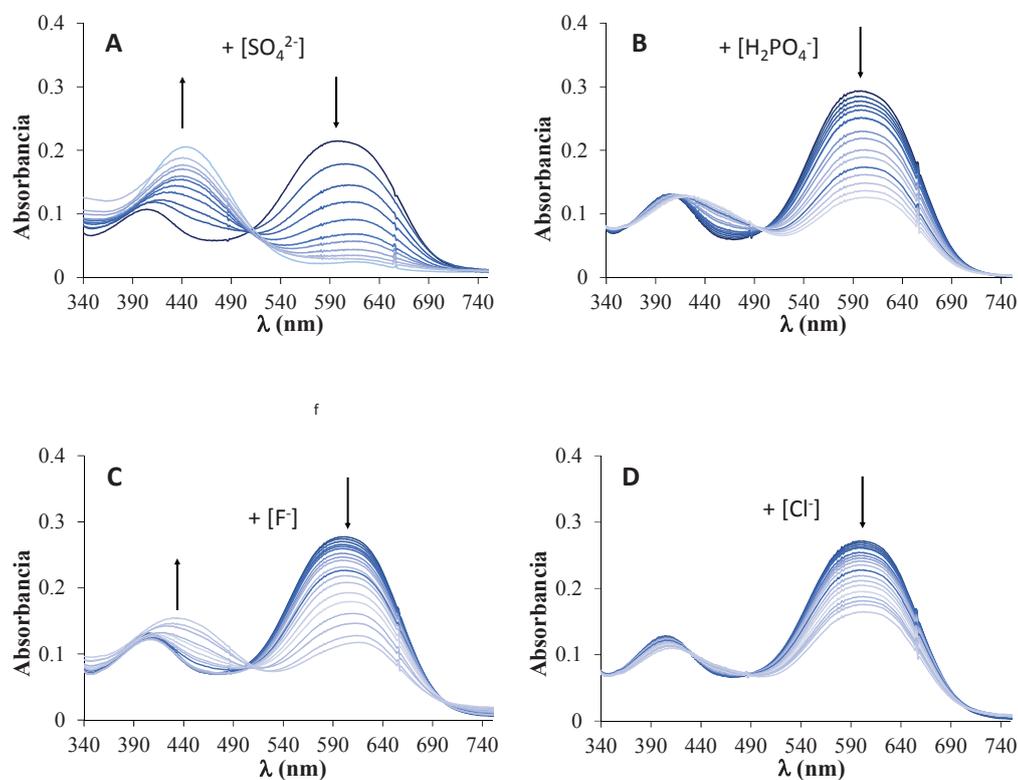


Figura 8.10. Ensayos de desplazamiento realizados sobre el sistema VB-BSq con diferentes aniones.

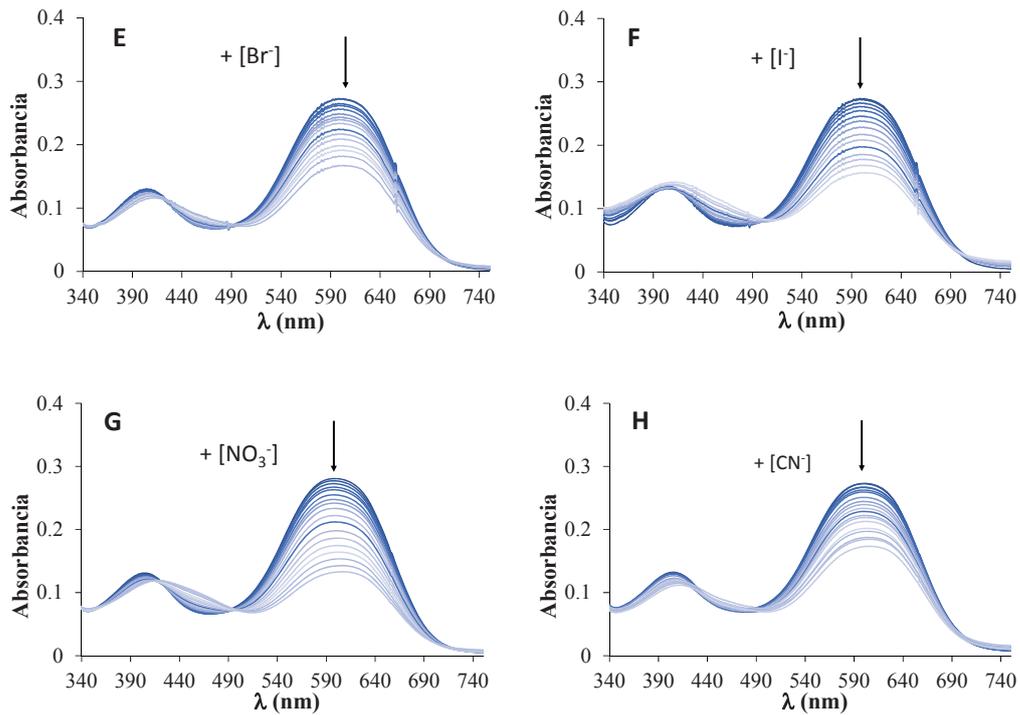


Figura 8.10. Ensayos de desplazamiento realizados sobre el sistema VB-BSq con diferentes aniones.

En la figura 8.11 se muestran, como ejemplo, imágenes de las disoluciones tras las valoraciones con los aniones para el sistema VB- BNH_3^+ . De izquierda a derecha aparece la disolución inicial de indicador, la disolución de indicador más el sistema híbrido y a partir de ahí, el sistema VB- BNH_3^+ tras la adición de los diferentes aniones empleados en este estudio.

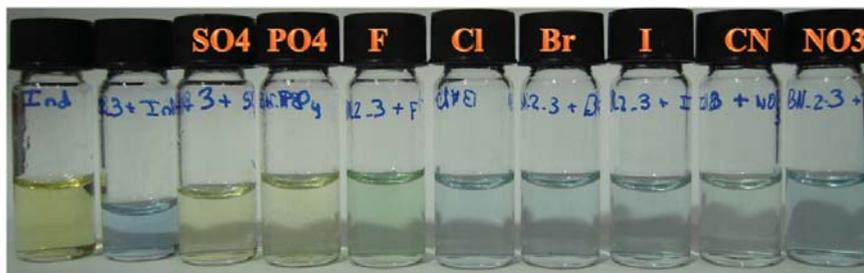


Figura 8.11. Imagen de las disoluciones tras los ensayos de desplazamiento.

Para poder comparar los resultados en su conjunto se ha representado de nuevo la relación entre la absorción máxima (pico) y mínima (valle) para la forma ácida del indicador, para cada anión y sistema (figura 8.12). Es muy importante destacar que el sistema BNH_3^+ , que consiste en una amina primaria protonada, es capaz de detectar tanto al anión sulfato como al dihidrogenofosfo en disolución acuosa. Estos resultados serían del todo imposibles si únicamente se repitiera el ensayo con el ligando sin las nanopartículas. De estos resultados se comprueba una vez más que las nanopartículas tienen un papel fundamental en el diseño de quimiosensores en disolución acuosa, ya que permiten el uso de moléculas sencillas que por sí solas no producirían ningún efecto.

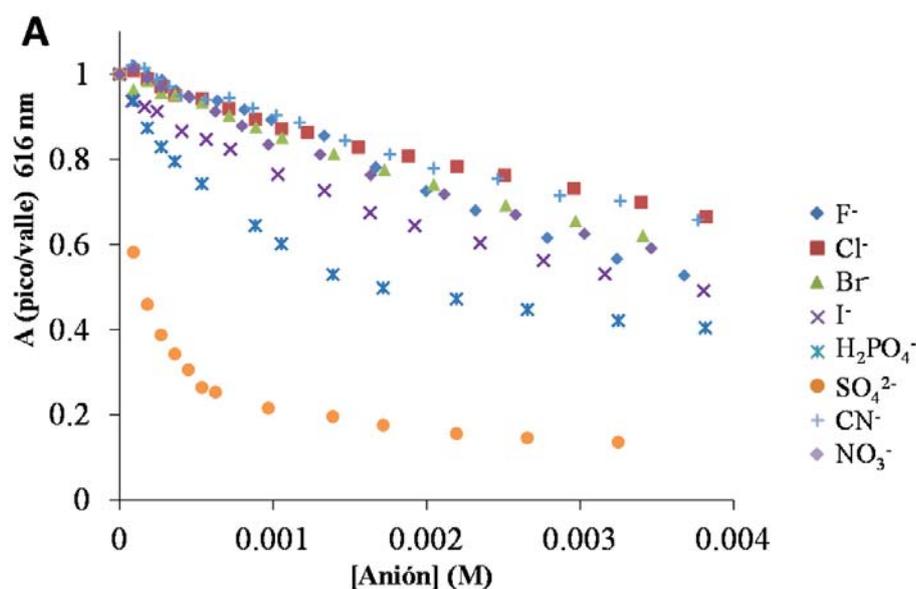


Figura 8.12. Cambios en los espectros de absorción del sistema VB- BNH_3^+ (A).

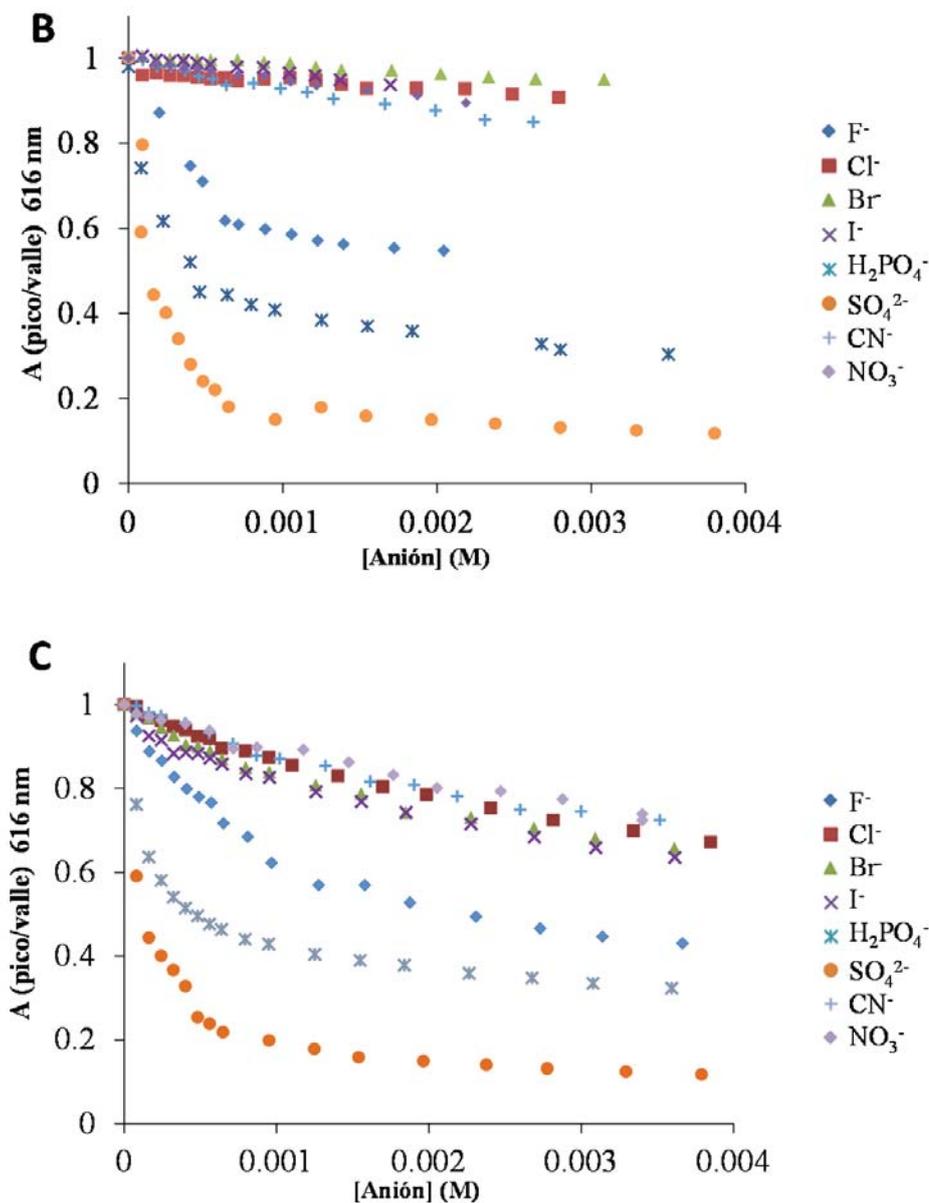


Figura 8.12. Cambios en los espectros de absorción del sistema VB-BSq (B) y VB-B2Sq2N⁺ (C) tras la adición de cantidades crecientes de diferentes aniones.

A partir de las valoraciones realizadas en los ensayos de desplazamiento, se han calculado de nuevo los logaritmos de las constantes asociadas al equilibrio de desplazamiento del VB (tabla 8.3). De forma general se puede decir que el sulfato es el anión que interacciona más fuertemente con todos los sensores híbridos sintetizados. Los aniones

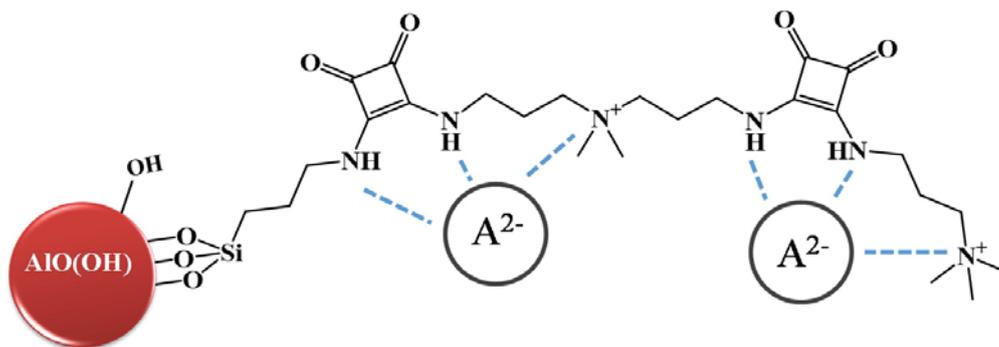
monovalentes son capaces de ser reconocidos en cierto grado siendo un caso extremo el reconocimiento del fluoruro por parte del sistema BSq.

Tabla 8.3. Logaritmos de las constantes asociadas al desplazamiento del VB por parte de los sistemas híbridos.

	BSq	B2Sq2N⁺	BNH₃⁺
F⁻	4.33 (2) ^a	2.62 (2)	1.39
Cl⁻	2.55 (1)	2.06 (2)	2.09 (3)
Br⁻	2.68 (4)	1.96 (6)	2.43 (4)
I⁻	2.58 (3)	2.26 (4)	1.37 (3)
CN⁻	2.55 (8)	2.21 (5)	2.59 (3)
NO₃⁻	2.66 (5)	2.23 (7)	1.79 (5)
SO₄²⁻	5.51 (5)	12.04 (2:1 M:L)	3.97 (1)
		7.21 (1:1 M:L)	
H₂PO₄⁻	5.42 (6)	8.99 (2:1 M:L)	4.27 (2)
		4.63 (1:1 M:L)	

a) Los números entre paréntesis indican las desviaciones estándar en la última cifra significativa.

Todas las curvas se ajustan en mayor o menor grado a un modelo 1:1 metal:ligando (M:L) a excepción de las obtenidas por el receptor B2Sq2N⁺ con sulfato y dihidrogenofosfato. Debido a la presencia de dos unidades escuaramida y dos aminas cuaternizadas es factible la formación de especies con estequiometría 2:1 M:L (esquema 8.6).



Esquema 8.6. Representación esquemática de la formación de especies 2:1 M:L para el sistema B₂Sq₂N⁺.

Teniendo en cuenta este escenario, la formación de la especie 1:1 favorecería una segunda interacción entre la unidad escuaramídica restante. Debido a esto, un número adicional de moléculas de agua localizadas en las esferas de solvatación se liberan al medio lo que ayuda a una estabilización extra del complejo dianiónico.

8.7. Conclusiones.

En este capítulo de tesis se ha modificado la superficie de nanopartículas de bohemita con ligandos que contenían unidades escuaramídicas, amina cuaternizadas o una combinación de ellas. Además se ha introducido como alternativa a la amina cuaternizada, una amina primaria protonada. Esto ha permitido la síntesis de quimiosensores híbridos capaces de detectar sulfato frente a una serie de especies aniónicas. Además, en algunos casos ha sido posible la discriminación de sulfato frente a hidrogenofosfato de manera reproducible.

Es necesario enfatizar el hecho de que ninguno de los componentes orgánicos ya sea individualmente (la amina cuaternizada o el grupo

escuaramida) o combinados entre sí, serían capaces de realizar el mismo reconocimiento aniónico alcanzado por los sistemas híbridos en disolución acuosa.

Se ha demostrado que las nanopartículas juegan un papel crucial en la organización y la pre-concentración de las moléculas orgánicas favoreciendo la desolvatación de los aniones y su interacción con las moléculas orgánicas. A partir de estos resultados obtenidos se demuestra una vez más que las nanopartículas tienen un papel fundamental en el diseño de quimiosensores en disolución acuosa:

- Permiten trabajar en disolución acuosa con moléculas insolubles en agua.
- Permiten el uso de moléculas sencillas que por sí solas no producirían ningún efecto.
- Sirven de soporte de la molécula orgánica, permitiendo la recuperación del quimiosensor una vez llevado a cabo el ensayo de reconocimiento para posteriores usos.

8.8. Bibliografía

[1] a) J. W. Steed, *Chem. Commun.*, 2006, 2637. b) N. H. Evans, P. D. Beer, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2014, 53, 11716.

[2] E. A. Katayev, Y. A. Ustynyuk, J. L. Sessler, *Coord. Chem. Rev.*, 2006, 50, 3004.

[3] a) J. W. Steed, J. L. Atwood, *Supramolecular Chemistry*, John Wiley & Sons Ltd., 2nd edn, 2009. b) J.-M. Lehn, *Supramolecular Chemistry: Concepts and Perspectives*, VCH, Weinheim, Germany, 1995. c) A. Bianchi, K. Bowman-James, E. García-España, *Supramolecular Chemistry of Anions*, Wiley-VCH, New York, 1997. d) J. L. Sessler, P. A. Gale, W. S. Cho, *Anion Receptor Chemistry*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 2006.

[4] Y. Marcus, *Ion Properties*, Marcel Dekker, New York, 1997.

[5] P. D. Beer, P. A. Gale, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2001, 40, 486.

[6] K. Bowman-James, *Acc. Chem. Res.*, 2005, 38, 671.

[7] a) P.A. Gale, *Coord. Chem. Rev.*, 2003, 240, 191. b) I. Ravikumar, P. Gosh, *Chem. Soc. Rev.*, 2012, 41, 3077.

[8] H. Weingärtner, E. U. Franck, G. Wiegand, N. Dahmen, G. Schwedt, F. H. Frimmel, B. C. Gordalla, K. Johannsen, R. S. Summers, W. Höll, M. Jekel, R. Gimbel, R. Rautenbach, W. H. Glaze, *Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2000.

[9] Y. Zhang, P. S. Cremer, *Current Opinion in Chemical Biology*, 2006, 10, 658.

[10] a) P. Lo Nostro, B. W. Ninham, *Chem. Rev.*, 2012, 112, 2286. b) F. P. Schmidtchen, *Chem. Soc. Rev.*, 2010, 39, 3916.

[11] a) Z. Wang, H. Luecke, N. Yao, F. A. Quioco, *Nat. Struct. Biol.*, 1997, 4, 519. b) J. W. Pflugrath, F. A. Quioco, *J. Mol. Biol.*, 1988, 200, 163.

[12] a) P. A. Gale, *Amide- and Urea-Based Anion Receptors*, in *Encyclopedia of Supramolecular Chemistry*, ed. J. L. Atwood and J. W. Steed, Marcel Dekker, New York, 2004, pp. 31–41. b) M. C. Rotger, M. N. Piña, A. Frontera, G. Martorell, P. Ballester, P. M. Deyà, A. Costa. *J. Org. Chem.*, 2004, 69, 2302. B) D. Quiñonero, R. Prohens, C. Garau, A. Frontera, P. Ballester, A. Costa, P. M. Deyà, *Chem. Phys. Lett.*, 2002, 351, 115.

[13] Edited by B. Smith, *Synthetic Receptors for Biomolecules: Design Principles and Applications*, RSC, 2015.

[14] a) A. Rostami, A. Colin, X. Y. Li, M. G. Chudzinski, A. J. Lough, M. S. Taylor, *J. Org. Chem.*, 2010, 75, 3983. b) S. Kubik, *Chem. Soc. Rev.*, 2010, 39, 3648.

[15] a) Y. Geng, S. Romsted, *J. Phys. Chem. B*, 2005, 109, 23 629. b) J. L. Sessler, D. E. Gross, W. Cho, V. M. Lynch, F. P. Schmidtchen, G. W. Bates, M. E. Light, P. A. Gale, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, 128, 12 281.

[16] F. M. Winnik, *Chem. Rev.*, 1993, 93, 587.

[17] E. Delgado-Pinar, N. Montoya, M. Galiana, M. T. Albelda, J. C. Frías, H. R. Jiménez, E. García-España, J. Alarcón, *New J. Chem.*, 2010, 34, 567.

[18] P. Gans, A. Sabatini, A. Vacca, *Talanta*, 1996, 43, 1739.

[19] D. A. Giljohann, D. S. Seferos, W. L. Daniel, M. D. Massich, P. C. Patel, C. A. Mirkin, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2010, 46, 3280.

9.

**Nanopartículas de bohemita
modificadas para la detección de
yoduro en agua.**



9.1. Introducción.

El capítulo 8 se ha centrado en el desarrollo de un quimiosensor capaz de reconocer sulfato en agua. Sin embargo, dentro del grupo de aniones más estudiados también se encuentra el yoduro tanto por su importancia biológica como medioambiental. Este anión es una diana de especial interés ya que se encuentra dentro de los micronutrientes esenciales para el crecimiento del ser humano, y juega un papel clave en la función de la glándula tiroidea.¹ Tanto un defecto como un exceso de yoduro es el responsable de varias enfermedades relacionadas con esta glándula.² Por ejemplo, un exceso de yoduro en el agua de consumo, puede provocar enfermedades como creatinismo o tiroiditis en el ser humano.³ Además, el yoduro no está presente únicamente en el ámbito biológico, sino que también se encuentra en el campo del medioambiente. El yodo elemental se utiliza tanto en la síntesis de compuestos orgánicos como en la fabricación de medicinas.⁴ Por lo tanto, es importante desarrollar métodos que sean rápidos, sensibles y selectivos para la detección de yoduro en productos farmacéuticos, alimentarios o incluso en muestras biológicas.

En la bibliografía existen diferentes metodologías que se han desarrollado de cara a la detección de este anión. Entre ellos se encuentran la cromatografía,⁵ la electroforesis capilar⁶ o la absorción atómica.⁷ Sin embargo, todas estas técnicas se caracterizan por el uso de instrumentación muy sofisticada y de elevado precio, y en la mayoría de los casos es necesario un pretratamiento de las muestras. En este sentido, es preferible el empleo de ensayos colorimétricos o fluorimétricos debido a su alta sensibilidad, bajo coste así como a la sencillez de la instrumentación y la

posibilidad de miniaturización del equipo, lo que permite transportarlo y realizar la medida *in situ*.

En la literatura se pueden encontrar trabajos que han empleado la espectroscopía UV-vis o de fluorescencia como técnica para la detección de aniones.⁸ Sin embargo, en la mayoría de los casos se han usado ligandos orgánicos que implican una síntesis compleja. Por otra parte, muchas veces estos iones se encuentran en agua, lo que impide el uso de receptores orgánicos que sólo son solubles en medios apolares.⁹

9.2. Detección de haluros mediante la espectroscopía de fluorescencia.

En el capítulo 1 se han comentado los mecanismos de desactivación de una molécula desde el estado excitado al estado fundamental. De manera general, la emisión de luz puede ocurrir principalmente mediante dos procesos: fluorescencia y fosforescencia dependiendo de si el estado excitado es un estado singlete o triplete respectivamente. Debido a que la fosforescencia tiene tiempos de vida largos, no se suele observar en disolución a temperatura ambiente, mientras que sí es posible observar procesos de relajación mediante fluorescencia en disolución y en ausencia de una molécula desactivadora. Esta diferencia es debida principalmente a que existen varios mecanismos de desactivación no radiativos que pueden competir con la emisión de radiación.

En la figura 9.1 se muestran las diferentes formas en las que se puede desactivar la emisión de fluorescencia. Si el fluoróforo es un grupo electrón dador y el estado excitado es un grupo electrón aceptor, puede darse un mecanismo de transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET, por *Förster resonance energy transfer*), un tipo de desactivación no

radiativo; o puede ocurrir que exista una molécula que desactive la emisión de fluorescencia por colisión con el fluoróforo sin que el éste o la molécula desactivadora sean alteradas químicamente en el proceso. Se pueden aprovechar estos procesos de desactivación de la fluorescencia y de la fosforescencia debido a la presencia de aniones haluro para detectarlos y cuantificarlos en disolución acuosa.

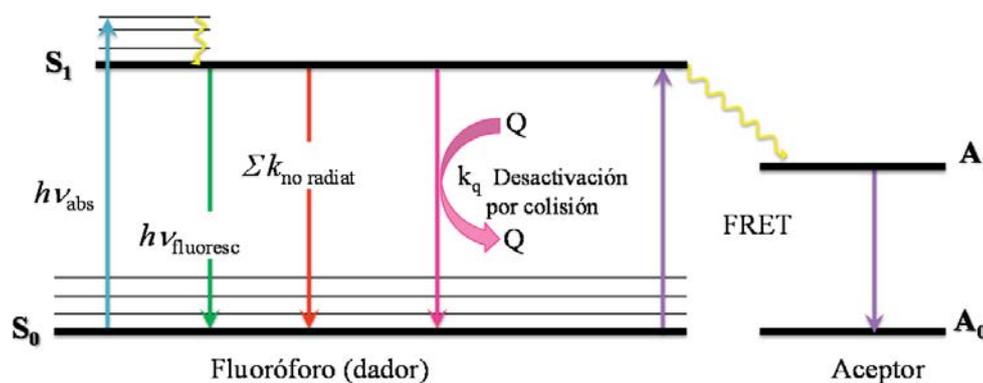


Figura 9.1. Diagrama de Jablonski modificado que muestra el proceso de absorción (azul), la relajación radiativa (verde), procesos de desactivación no radiativos (rojo) y otros procesos de vuelta al estado fundamental como la desactivación por colisión (rosa) y por FRET (morado).

La desactivación de la emisión de fluorescencia de ciertos compuestos aromáticos debido a la presencia de aniones haluros es conocida desde hace ya años. Existen trabajos en los que se ha empleado quinina,¹⁰ naftaleno,¹¹ coumarina,¹² rodamina¹³ y varios heterociclos polinucleares aromáticos¹⁴ como unidades fluorescentes para la detección de haluros y algunos *pseudohaluros* (cianuro, tiocianato, etc). Como resultado de la desactivación de la fluorescencia se produce una disminución de la emisión y de los tiempos de vida, por lo que a partir de la medida de estos dos parámetros es posible cuantificar la concentración del haluro.

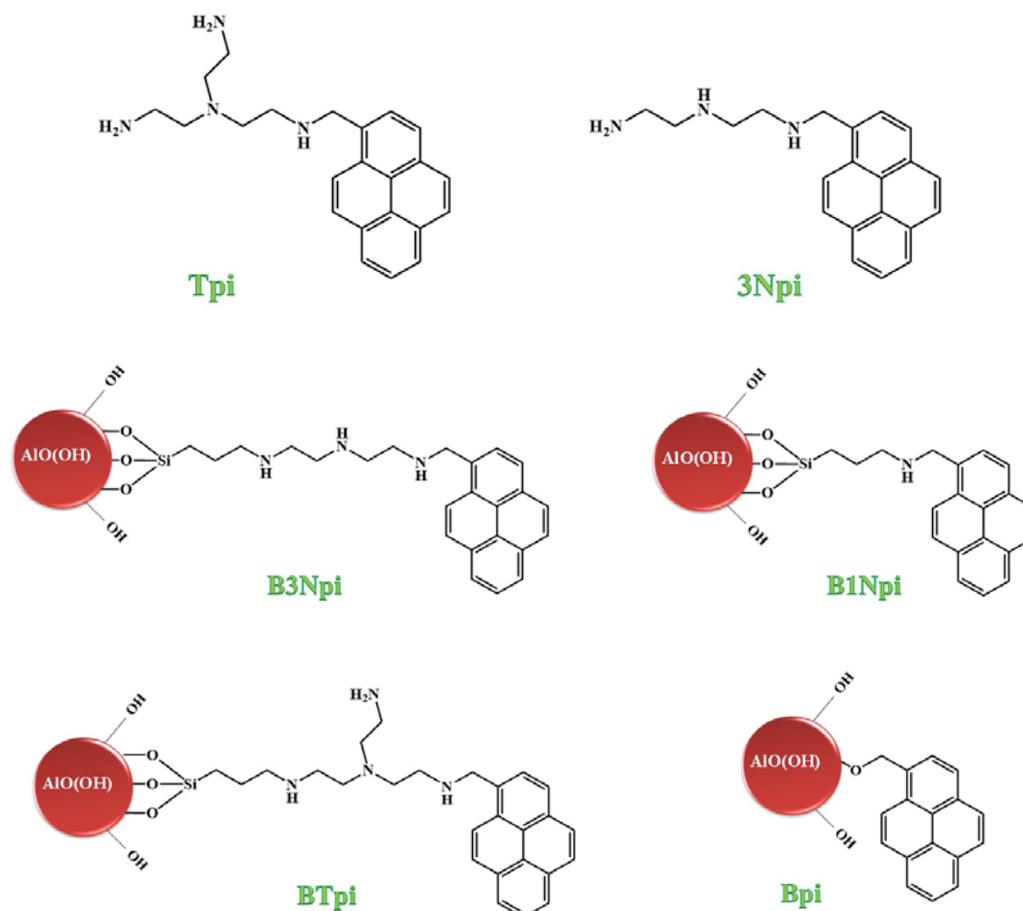
La determinación de aniones haluro mediante la desactivación de la fluorescencia es un método muy popular debido a que es posible trabajar a concentraciones muy bajas (del orden de micromolar) y a la simplicidad de las reacciones de desactivación. Además, las reacciones que tienen lugar normalmente son no destructivas y se pueden aplicar casi a cualquier sistema que tenga una unidad fluorófora en su estructura.¹⁵

9.3. Sistemas empleados.

En capítulos previos de esta memoria se ha demostrado la eficacia del uso de nanomateriales en la síntesis de quimiosensores para el reconocimiento de especies cargadas en disolución acuosa. Además, se han preparado nanopartículas de diferentes materiales y tamaños, lo que ha permitido estudiar la efectividad de la reacción de funcionalización de la superficie con diferentes moléculas orgánicas, así como la sensibilidad y la efectividad del quimiosensor híbrido final.¹⁶ Otra característica que presenta el uso de nanomateriales en el diseño de quimiosensores es la posibilidad de mejorar la eficacia del sistema híbrido respecto a la molécula libre por un efecto de “pre-concentración” de los ligandos orgánicos en una superficie.¹⁷ Por ello, además de sintetizar los sistemas híbridos orgánico-inorgánicos, se han preparado las moléculas orgánicas libres para estudiar las posibles diferencias entre ellos.

El esquema 9.1 muestra las estructuras de los sistemas que se van a estudiar tanto en su forma libre como anclados. Como unidad receptora se ha empleado, por un lado, el ligando tripodal tris(2-aminoetil)amina que contiene dos aminas primarias y una amina secundaria (abreviada como T en el nombre de los sistemas híbridos finales), mientras que por otro lado,

se ha sintetizado una poliamina abierta que contiene una amina primaria y dos aminas secundarias (indicado en el nombre como 3N). Ambos ligandos han sido modificados con una unidad de pireno (pi) como unidad señalizadora (Tpi y 3Npi respectivamente).



Esquema 9.1. Estructura química de los ligandos libres de los sistemas híbridos empleados en la detección de yoduro.

Para obtener los sistemas híbridos, se ha anclado el ligando Tpi y el 3Npi a la superficie de nanopartículas de bohemita (BTpi y B3Npi respectivamente). Además se ha anclado una cadena que contiene un único átomo dador para estudiar la influencia de la longitud de la cadena en la respuesta fotoquímica del quimiosensor (B1Npi). Por último, se ha modificado la superficie de la bohemita únicamente con unidades pireno

para poder emplearlo como referencia en los estudios fotoquímicos realizados (Bpi).

9.3.1. Comportamiento ácido-base.

9.3.1.1. Determinación de las constantes de protonación.

En el caso de ligandos poliamínicos no soportados, es posible estudiar la basicidad de las aminas presentes en la estructura mediante estudios potenciométricos. Mediante esta técnica se pueden determinar las constantes de basicidad de los ligandos. En la tabla 9.1 se recogen los valores de los logaritmos de las constantes de basicidad sucesivas para los ligandos Tpi y 3Npi.

Tabla 9.1. Logaritmos de las constantes de protonación sucesivas y de basicidad global para los receptores Tpi y 3Npi determinados a 298.1 ± 0.1 K en NaCl $0.15 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Reacción	Tpi	3Npi
$\text{H} + \text{L} \rightleftharpoons \text{HL}^{\text{a}}$	9.90 (1) ^b	9.58 (3)
$\text{HL} + \text{H} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{L}$	8.66 (1)	8.32 (2)
$\text{H}_2\text{L} + \text{H} \rightleftharpoons \text{H}_3\text{L}$	6.62 (2)	4.35 (2)
$\text{Log } \beta^{\text{c}}$	25.18	22.24

a) Cargas omitidas. b) Los números entre paréntesis indican la desviación estándar de la última cifra significativa. c) La constante de basicidad global es $\beta = \sum K_{\text{HjL}}$.

Se han obtenido tres constantes de basicidad para el ligando Tpi. Las dos primeras más básicas ($\log K_1 = 9.90$ y $\log K_2 = 8.66$) y una tercera intermedia ($\log K_3 = 6.62$). Fijándonos en la estructura química del receptor, en los valores obtenidos mediante potenciometría y en la bibliografía que existe para ligandos similares,¹⁸ se puede proponer que los dos primeros protones se situarían en los nitrógenos primarios de la cadena del receptor, que como es sabido son más básicos en disolución acuosa que los secundarios debido a la mejor solvatación de los grupo amino primarios. La tercera y última protonación correspondería al grupo amino secundario de la cadena funcionalizada con el pireno.

La poliamina lineal 3Npi presenta dos constantes de protonación relativamente altas ($\log K_1 = 9.58$ y $\log K_2 = 8.32$) y otra constante mucho más baja ($\log K_3 = 4.35$). Se puede proponer una secuencia de protonación en base a la minimización de la repulsión culombiana que existe entre cargas del mismo signo. Los dos primeros protones se sitúan lo suficientemente alejados para que no exista repulsión entre cargas del mismo signo, por lo que la entrada del tercer protón se produciría en el grupo amino secundario central. Debido a que esta última protonación introduce fuertes repulsiones electrostáticas, el valor de la tercera constante es baja.¹⁹

El programa Hyss²⁰ es una herramienta útil a la hora de saber qué especies se encuentran en disolución a un determinado pH. En la figura 9.2 se muestran los diagramas de distribución para los ligandos Tpi y 3Npi calculados a partir de los datos de la tabla 9.1.

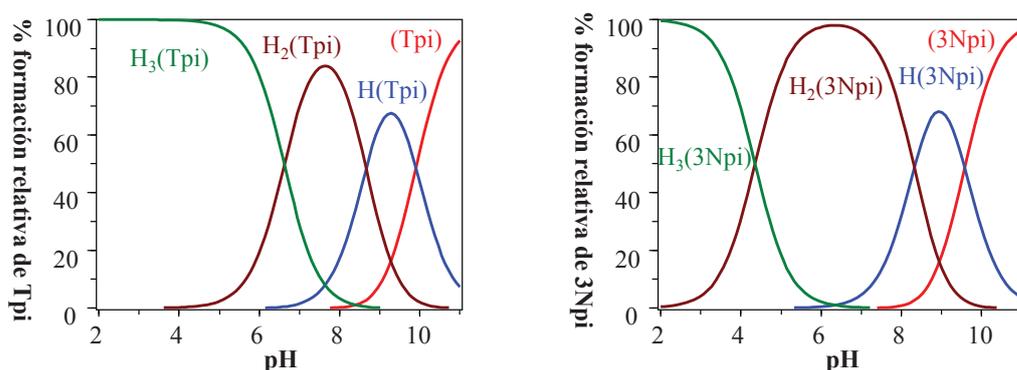


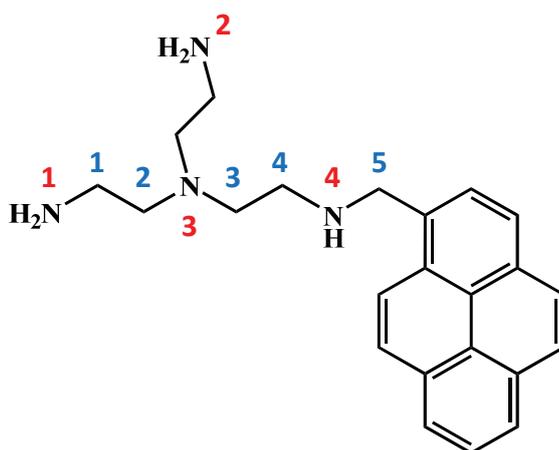
Figura 9.2. Diagramas de distribución de especies para la protonación de los ligandos Tpi (izquierda) y 3Npi (derecha) medidos en NaCl 0.15 mol·dm⁻³.

Las secuencias de protonación que se han propuesto para los ligandos Tpi y 3Npi se pueden corroborar mediante resonancia magnética nuclear. La variación de las señales de los espectros de RMN en función del pH del medio proporciona información sobre la distribución de cargas positivas en los distintos centros protonables de los receptores.²¹ La protonación de los grupos amino presentes en las moléculas no afecta por igual a todos los núcleos de la estructura. Los carbonos situados en β y los protones situados en α con respecto a un nitrógeno protonable son los que experimentan los cambios más significativos. Por norma general, se observa que la protonación de los nitrógenos hace que las señales de protón se desplacen a campo bajo mientras que las señales de carbono lo hacen a campo alto.

9.3.1.2. Determinación de las secuencias de protonación.

Se han realizado espectros de RMN de ¹H y ¹³C a diferentes pHs y además, para la asignación de las distintas señales se han realizado espectros de correlación de RMN ¹H-¹³C (HSQC). La numeración de los

diferentes núcleos se muestra en el esquema 9.2 (Tpi) y 9.3 (3Npi) (se ha numerado en azul los carbonos y en rojo los nitrógenos). Los valores de pH a los que se registran los espectros se eligen a partir de los diagramas de distribución de especies, de forma que se correspondan con el mayor % de formación relativa de las distintas especies presentes en disolución. Hay que recordar también que en disolución nos encontramos con situaciones promedio, ya que en los estados de protonación intermedios de una molécula, los protones pueden situarse en varias posiciones con una distribución que vendrá controlada por las microconstantes de basicidad de los mismos.²²



Esquema 9.2. Numeración empleada en la asignación de señales para los espectros de RMN del ligando Tpi.

Mientras que la parte alifática del espectro da información importante relativa a la secuencia de protonación del ligando, no sucede lo mismo con la parte aromática del espectro donde el desplazamiento de las señales no es significativo y no da información relevante, por lo que sólo se va a analizar la parte alifática.

En la figura 9.3 se muestran los espectros de RMN de ^{13}C a diferentes pHs. Al pasar de pH 10.98 (donde tenemos el ligando no protonado) a pH 9.20 (donde se encuentra la especie monoprotionada) se produce un desplazamiento muy significativo de la señal **C2**, y al llegar a pH 7.6 (especie diprotionada) se sigue observando un desplazamiento, esta vez más pequeño, de la misma señal. Cuando se pasa de pH 7.6 a pH 2.0 (especie triprotionada), la señal que experimenta un mayor desplazamiento a campo bajo es el carbono **C3**. El desplazamiento de estas señales indica que la primera y la segunda protonación ocurren mayoritariamente sobre los grupos amino primario **N1** y **N2**, más básicos en disolución acuosa, que el grupo amino secundario **N4**.

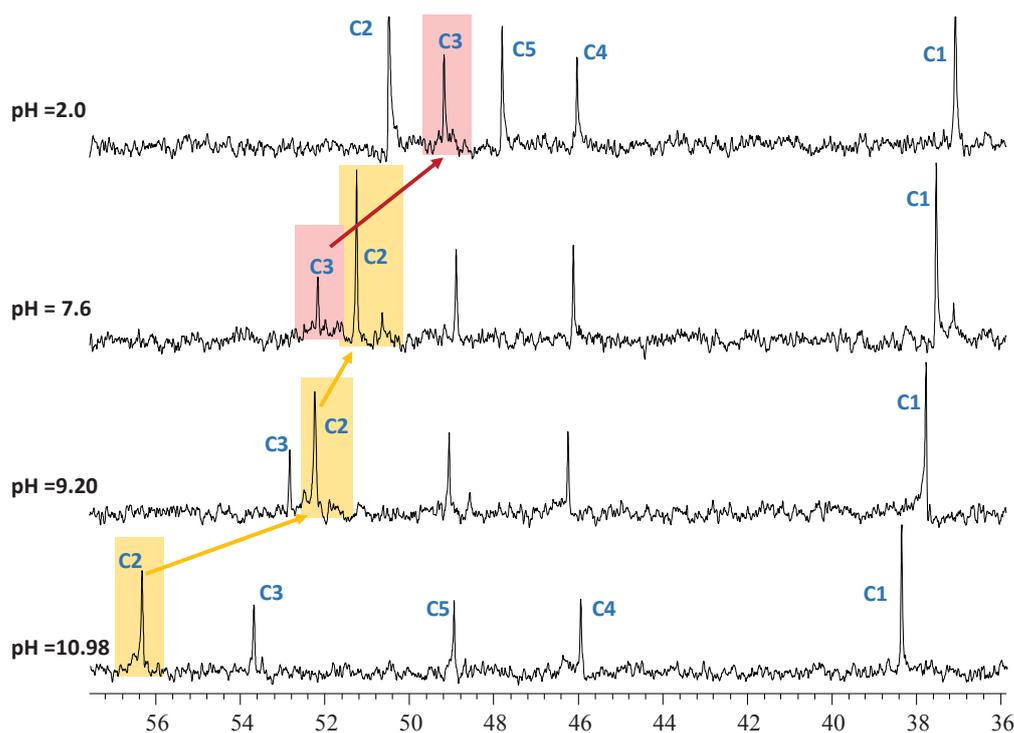


Figura 9.3. Zona alifática de los espectros de ^{13}C RMN del compuesto Tpi en D_2O a diferentes valores de pH.

Así pues, los datos de RMN corroboran la secuencia de protonación que se propuso en el apartado anterior en función de las constantes de basicidad obtenidas (figura 9.4).

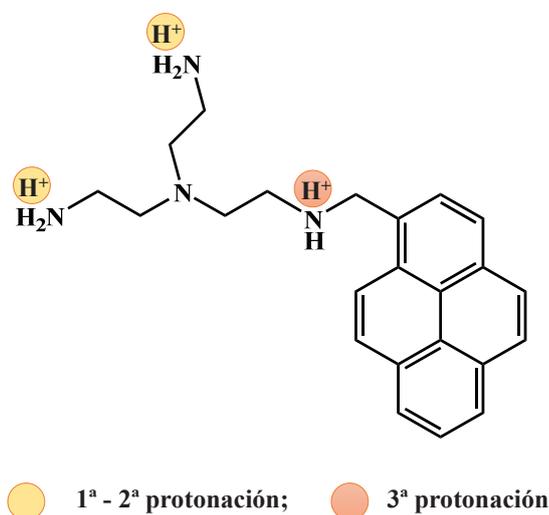
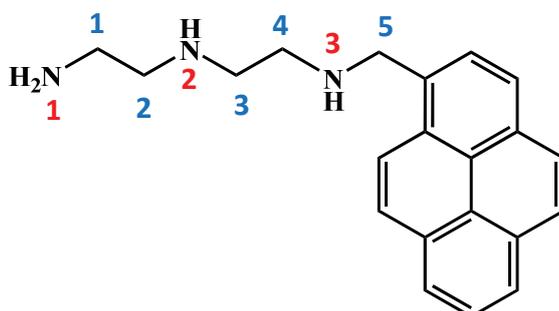


Figura 9.4. Secuencia de protonación propuesta para el receptor Tpi.

Se han realizado los mismos experimentos de RMN de ^1H , ^{13}C y HSQC para el ligando 3Npi. La numeración de los diferentes núcleos se muestra en el esquema 9.3 (se ha numerado en azul los carbonos y en rojo los nitrógenos).



Esquema 9.3. Numeración empleada en la asignación de señales para los espectros de RMN del ligando 3Npi.

En la figura 9.5 se muestran los resultados obtenidos para las medidas de RMN de ^{13}C . Cuando se pasa de valores de pH 10.1 a pH 8.9 tiene lugar la primera protonación que afecta al N1, por lo que el cambio más significativo se aprecia en el desplazamiento de la señal de C2. Cuando el pH se ajusta sobre 6.3, la segunda protonación tiene lugar de manera mayoritaria sobre N3, para conseguir que las repulsiones electrónicas entre cargas sean mínima, por lo que la señal correspondiente a C3 es la que sufre un mayor desplazamiento. Por último, la tercera protonación tiene lugar cuando se acidifica la disolución hasta pH 2 y afecta a N2, lo que se demuestra por el mayor desplazamiento de las señales C1 y C4.

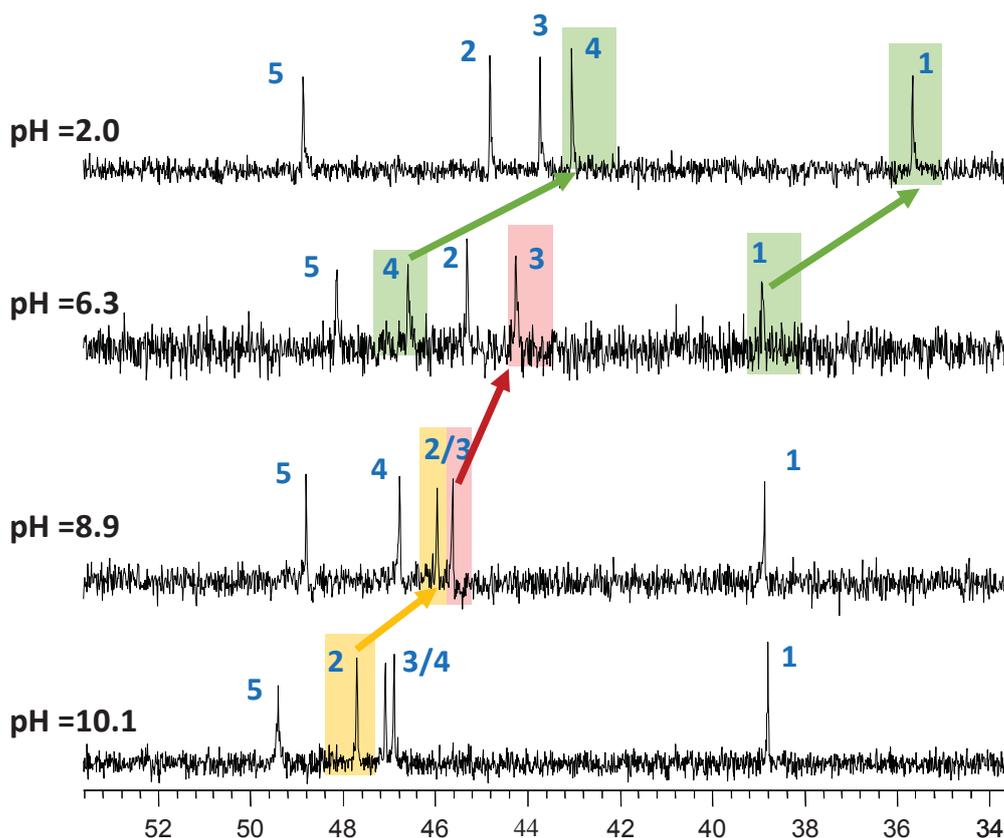


Figura 9.5. Zona alifática de los espectros de ^{13}C RMN del compuesto 3Npi en D_2O a diferentes valores de pH.

A partir de los datos obtenidos de RMN se puede plantear la secuencia de protonación para el ligando 3Npi que se representa en la figura 9.6.

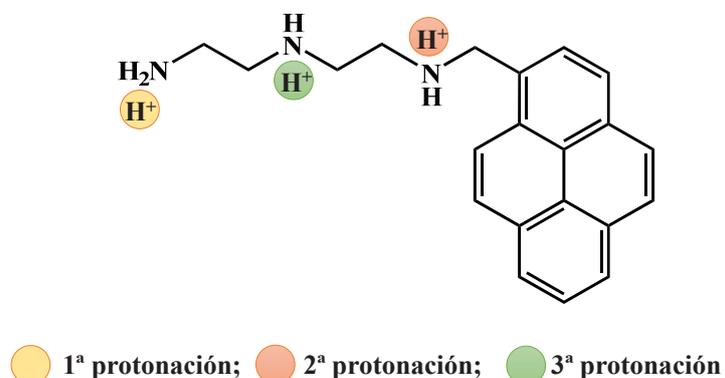


Figura 9.6. Secuencia de protonación propuesta para el receptor 3Npi.

9.4. Estudios fluorimétricos.

El espectro de emisión de fluorescencia del pireno en etanol se caracteriza por la presencia de cuatro bandas muy bien definidas, centradas a 375 nm, 383 nm, 395 nm, 416 nm y un pequeño hombro situado a 444 nm. Estas bandas se pueden atribuir a las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ de la emisión del monómero. El pico presente a 375 nm corresponde a la primera banda vibracional con la transición 0-0, mientras que la banda situada a 395 nm se corresponde con la tercera banda vibracional con la transición 0-2 (figura 9.7).

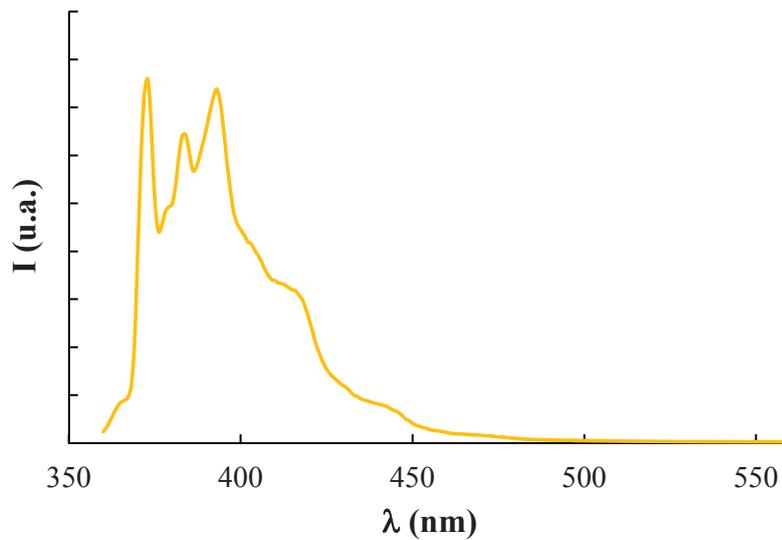


Figura 9.7. Espectro de emisión del pireno en etanol ($\lambda_{exc.} = 340$ nm).

A la hora de trabajar con los sistemas híbridos, se obtuvieron en primer lugar los espectros de absorción, excitación y emisión de fluorescencia. En la figura 9.8 se muestran los resultados obtenidos para el sistema B3Npi medidos en disolución acuosa a pH = 2 (figura 9.8).

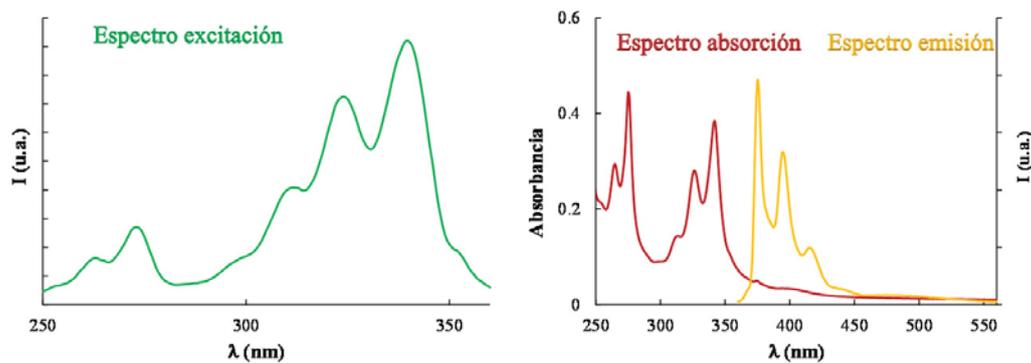


Figura 9.8. Espectros de excitación, absorción y emisión del sistema B3Npi ($\lambda_{exc.} = 340$ nm, $\lambda_{emis.} = 374$ nm).

El espectro de absorción del sistema B3Npi en agua muestra cuatro bandas características a 341 nm, 327 nm, 276 nm y 264 nm. El espectro de emisión de fluorescencia es la imagen especular del espectro de absorción, pero a diferencia del sistema que tenía unidades antraceno (capítulo 6), en este caso la superposición del espectro de absorción y emisión es mínima. El espectro de emisión se caracteriza por la presencia de tres bandas muy bien definidas, centradas a 375 nm, 395 nm y 416 nm, y un pequeño hombro situado a 444 nm. Dado que los estados electrónicos y vibracionales se encuentran acoplados, las bandas de emisión suelen ser muy útiles para estudiar la polaridad del medio. Así, en medios hidrófobos, la banda de 395 nm suele ser la más intensa, mientras que en medios polares, la intensidad de la banda situada a 375 nm es mayor.²³

Se llevaron a cabo las mismas medidas con el resto de sistemas para comprobar la emisión de fluorescencia y su estabilidad frente al pH (figura 9.9). En todos los casos se mantuvo la absorción a 340 nm constante y menor a 0.3 unidades. Como se puede ver en la gráfica, todas las muestras presentan una emisión correspondiente al monómero muy intensa y en ninguno de los casos se aprecia una aparición de una banda correspondiente a la formación de excímero. En el caso de las nanopartículas funcionalizadas, la ausencia de excímero pone de manifiesto que las moléculas de pireno se encuentran separadas entre sí en la superficie de las nanopartículas lo suficientemente para impedir su apilamiento. En el caso de las moléculas libres, tampoco se observa la formación de excímeros intramoleculares ni intermoleculares en las condiciones de concentración a la que se está trabajando.

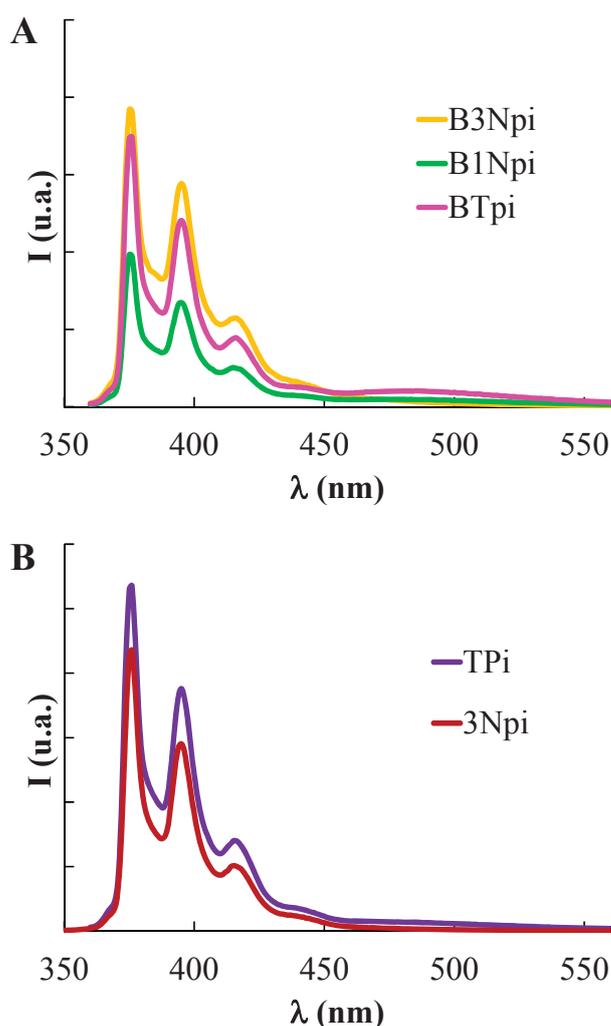


Figura 9.9. Espectro de emisión de los sistemas sintetizados en disolución acuosa a pH = 3 ($\lambda_{exc.} = 340$ nm).

9.4.1. Comportamiento ácido - base en disolución acuosa.

En el apartado anterior se describe la obtención de las constantes de basicidad de los ligandos en su forma libre que, junto a la valoración ácido-base realizada mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear ha permitido conocer la secuencia de protonación de los mismos. La presencia de un fluoróforo cerca de grupos amino permite corroborar la

secuencia de protonación obtenida hasta ahora. Como se ha mostrado en el capítulo 6, los átomos dadores con pares de electrones solitarios (en nuestro caso, grupos amino secundarios) son capaces de desactivar la emisión de fluorescencia debido a un mecanismo de transferencia electrónica fotoinducida (*PET*). Cuando el átomo dador se encuentra protonado, el par de electrones solitario deja de estar accesible por lo que ya no es posible el efecto *CHEQ*.

Las valoraciones ácido-base se han realizado en disolución acuosa en un intervalo de pH comprendido entre 2.0 y 11.0, manteniendo la absorción a 340 nm por debajo de 0.3 unidades. En la figura 9.10 se muestran los resultados obtenidos para el sistema Tpi. La representación del máximo de emisión de fluorescencia ($\lambda_{emis} = 374$ nm) junto con el diagrama de distribución de especies nos permite deducir cuales son las especies responsables de la emisión del pireno. Al igual que ocurre para ligandos similares, la máxima emisión de fluorescencia se observa cuando el ligando se encuentra totalmente protonado (H_3L). Una vez que se empieza a aumentar el pH, se produce una transferencia electrónica desde las aminas no protonadas al estado excitado del pireno, lo que provoca una disminución de la emisión de fluorescencia. Dependiendo de la distancia al fluoróforo, la desactivación puede ser parcial o completa¹⁹ En este caso, la desprotonación de la amina secundaria presente en la estructura del ligando produce la desactivación de la emisión.

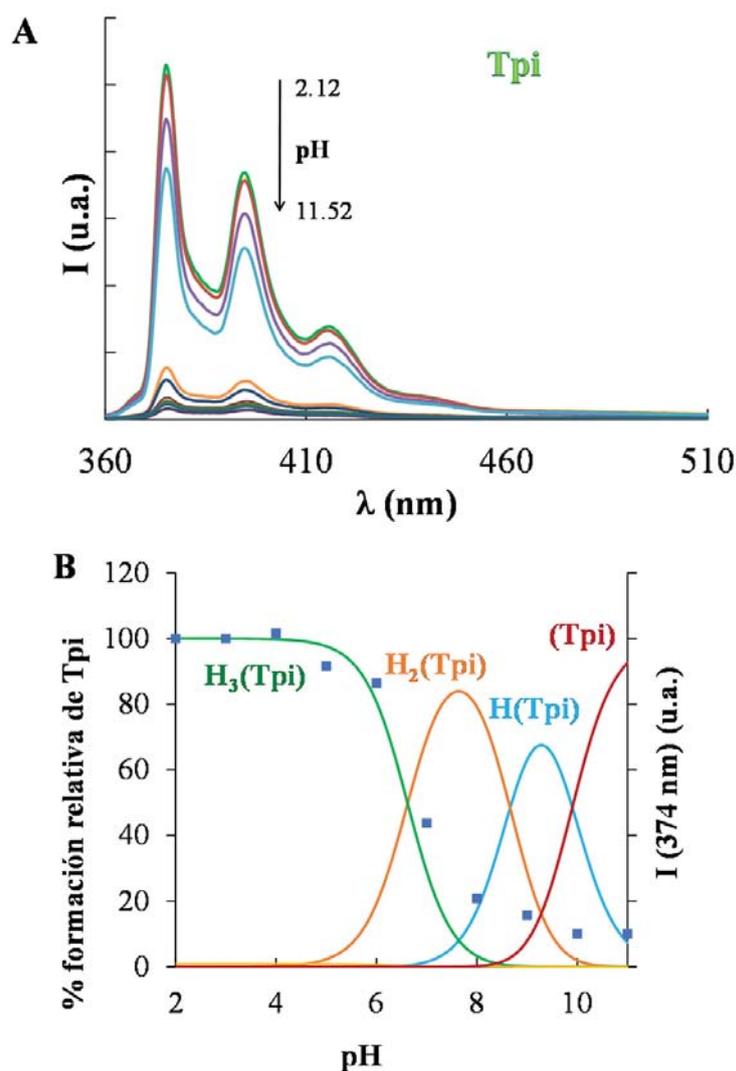


Figura 9.10. A) Variación del espectro de emisión de fluorescencia en función del pH del ligando Tpi ($\lambda_{exc.} = 340$ nm). B) Superposición del máximo de emisión de fluorescencia (■, $\lambda_{emis.} = 374$ nm) en el diagrama de distribución de especies del ligando Tpi determinado en NaCl $0.15 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a 298.1 ± 0.1 K.

Una vez que se conoce el comportamiento ácido-base del ligando libre se puede comparar con los resultados obtenidos para el sistema híbrido en el que se ha anclado el Tpi sobre la superficie de las nanopartículas. En la figura 9.11 se ha representado la variación de la emisión de fluorescencia en función del pH para el sistema BTpi donde se observa una disminución de las bandas de emisión al aumentar el pH. Si

comparamos estos resultados con los obtenidos para el ligando libre, se observa que la basicidad de los grupos amino no se ve modificada cuando el ligando se encuentra en una superficie sólida, y de nuevo, es la pérdida del primer protón la responsable de la desactivación de la emisión de fluorescencia del pireno.

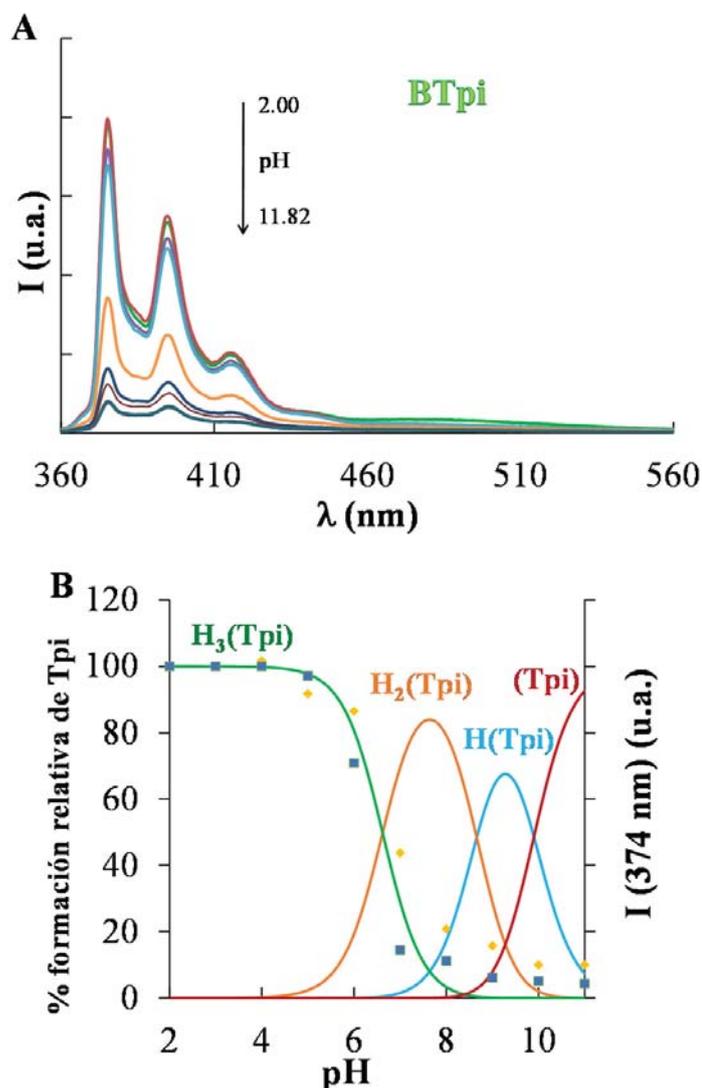


Figura 9.11. A) Variación del espectro de emisión de fluorescencia en función del pH del sistema híbrido BTpi ($\lambda_{exc.} = 340$ nm). B) Superposición del máximo de emisión de fluorescencia ($\lambda_{emis.} = 374$ nm) del ligando Tpi (■) y del sistema híbrido BTpi (◆) en el diagrama de distribución de especies del ligando Tpi determinado en NaCl $0.15 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a 298.1 ± 0.1 K.

Se han realizado las mismas valoraciones ácido-base para el sistema 3Npi y B3Npi (figura 9.12).

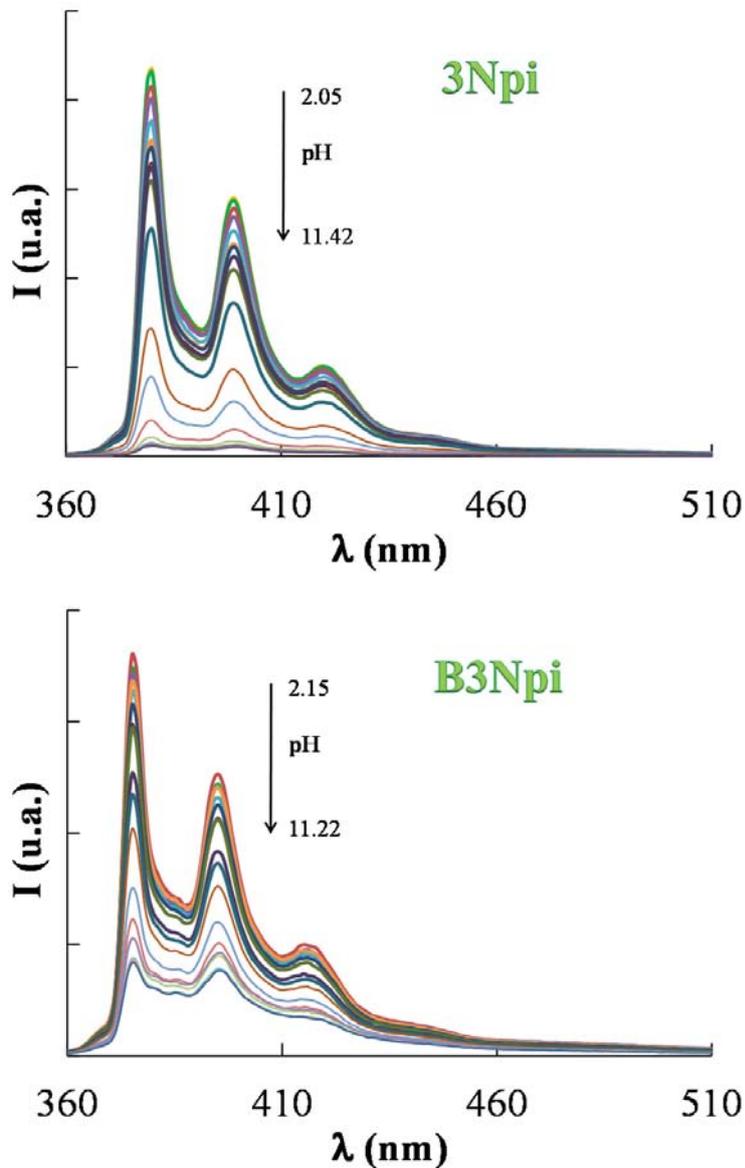


Figura 9.12. Variación del espectro de emisión de fluorescencia en función del pH de los sistemas híbridos 3Npi y B3Npi ($\lambda_{exc.} = 340$ nm).

En este caso la pérdida del primer protón situado en el grupo amino central de la cadena produce una ligera desactivación de la fluorescencia debido a la transferencia electrónica del par de electrones solitario al

fluoróforo. Cuando se pierde el segundo protón situado en la amina secundaria cercana al pireno, se produce la totalidad de la desactivación de la emisión debido de nuevo a un efecto PET. Si se comparan los resultados obtenidos para la cadena abierta con los del sistema híbrido B3Npi, se comprueba de nuevo que la unión covalente de los ligandos orgánicos a la superficie de las nanopartículas no modifica significativamente la basicidad de las aminas presentes en la estructura orgánica (figura 9.13). Sin embargo, sí se observan diferencias a valores de pH superiores a 8, ya que mientras que el sistema 3Npi pierde totalmente la fluorescencia, en el sistema B3Npi queda una emisión de fluorescencia residual. Esto puede ser debido a que los átomos de nitrógeno no protonados están formando puentes de hidrógeno con los protones de los grupos amino que aún se encuentran protonados.²⁴

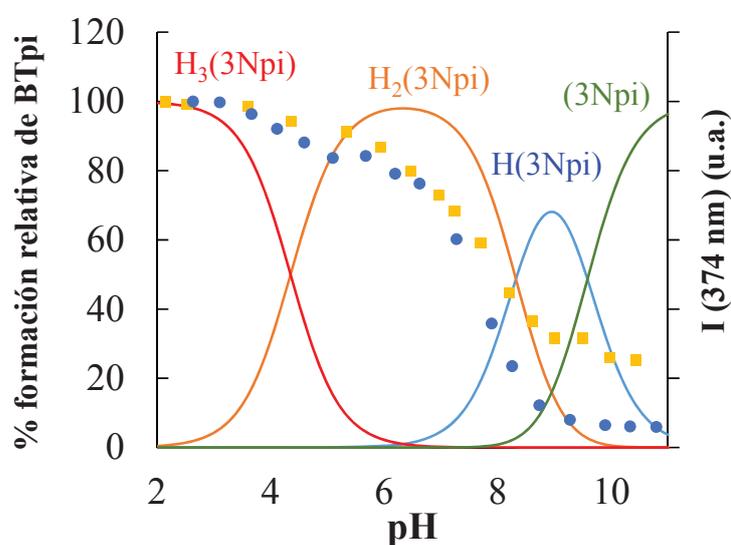


Figura 9.13. Superposición del máximo de emisión de fluorescencia ($\lambda_{\text{emis.}} = 374 \text{ nm}$) del ligando 3Npi (●) y del sistema híbrido B3Npi (■) en el diagrama de distribución de especies del ligando 3Npi determinado en NaCl $0.15 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a $298.1 \pm 0.1 \text{ K}$.

Por último se realizó la valoración del sistema híbrido B1Npi frente al pH (figura 9.14, A).

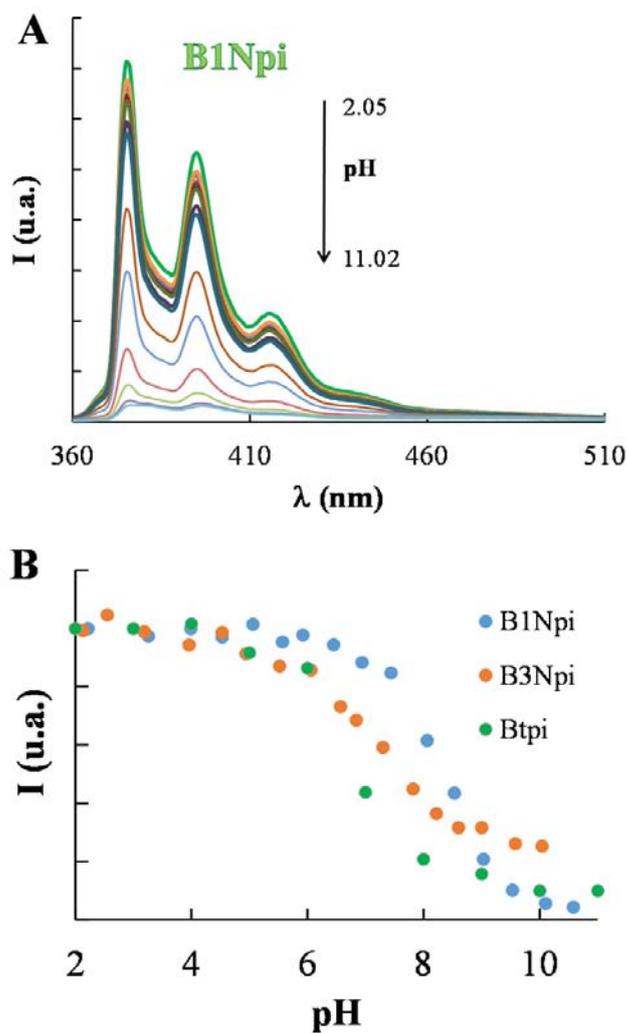


Figura 9.14. A) Variación del espectro de emisión de fluorescencia en función del pH del sistema B1Npi ($\lambda_{exc.} = 340$ nm). B) Máximo de emisión de fluorescencia de los sistemas híbridos B1Npi (●), B3Npi (●) y Btpi (●) frente al pH, ($\lambda_{emis.} = 374$ nm).

Este sistema muestra la misma pérdida en la emisión de fluorescencia que el resto de sistemas híbridos cuando se desprotona el grupo amino presente en su estructura. Además se ha comparado la

variación del máximo de emisión de fluorescencia con el pH para todos los sistemas híbridos, mostrando que todos ellos siguen el mismo perfil de desactivación de fluorescencia con ligeros cambios en el valor de pH al que sucede.

9.4.2. Medida de los principales parámetros fotoquímicos.

A la hora de caracterizar los procesos de desactivación que tienen lugar en nuestros sistemas se puede recurrir a una serie de parámetros cinéticos muy útiles como el rendimiento cuántico (Φ), los tiempos de vida (τ) y las constantes de velocidad para el proceso de desactivación radiativo (k_r^S) y no radiativo (k_{nr}^S).

En nuestro caso, se tienen procesos unimoleculares, por lo que la velocidad de desactivación sigue una cinética de primer orden. En la ecuación 9.1 se muestra la relación que existe entre los diferentes parámetros (para una descripción más detallada, ver apartado 1.2.2).

$$\Phi = k_r^S \tau = \frac{k_r^S}{k_r^S + k_{nr}^S} \quad (\text{ec. 9.1})$$

En la tabla 9.2 se recogen los resultados obtenidos para los tiempos de vida media, los rendimientos cuánticos y las constantes de velocidad de los procesos de desactivación radiativos y no radiativos de los sistemas estudiados. A partir de estos valores se pueden observar ciertas diferencias entre los ligandos libres y los que se encuentran unidos a las nanopartículas ya que en general, el rendimiento cuántico es mayor para los sistemas Tpi y 3Npi. Estos resultados son comparables a los encontrados en la

bibliografía donde se estudió la adsorción de diferentes grupos aromáticos en la superficie de SiO₂.²⁵ La disminución del rendimiento cuántico sugiere que existe cierta interacción entre el grupo aromático del pireno, y la superficie de las nanopartículas de bohemita.

Tabla 9.2. Principales parámetros fotoquímicos de los sistemas sintetizados en disolución acuosa a pH 3 bajo atmósfera de nitrógeno.

	Φ (%)	τ (ns)	k_r (x10 ⁶) (s ⁻¹)	k_{nr} (x10 ⁶) (s ⁻¹)
Tpi	51	138 ± 1	3.69	3.55
BTpi	36	127 ± 2	2.83	5.04
3Npi	55	162 ± 5	3.39	2.78
B3Npi	35	136 ± 1	2.57	4.78
B1Npi	22	159 ± 3	1.38	4.91

La posibilidad de que las unidades de pireno estén interaccionando con la superficie de las nanopartículas se puede comprobar al comparar los resultados obtenidos para el sistema B3Npi y B1Npi. Conforme se acorta la longitud de la cadena, o lo que es lo mismo, se acercan las unidades de pireno a la superficie sólida, el rendimiento cuántico se reduce de 35 para el sistema híbrido B3Npi a 22 para el sistema B1Npi. Para corroborar esta observación se sintetizó un último sistema híbrido en el que modificó la superficie de las nanopartículas con unidades de pireno (Bpi). En este caso, el rendimiento cuántico fue menor del 10%, lo que ratifica que la desactivación de la emisión de fluorescencia del pireno es debida a la interacción con el soporte sólido.

En cuanto a los valores de tiempos de vida media obtenidos, se puede decir que son similares para todos los compuestos y que no se han

encontrado grandes diferencias entre los valores de tiempo de vida media para los ligandos libres y para los sistemas híbridos. En la figura 9.15 se muestran los resultados obtenidos para los sistemas BTpi, B3Npi y B1Npi a pH 3.

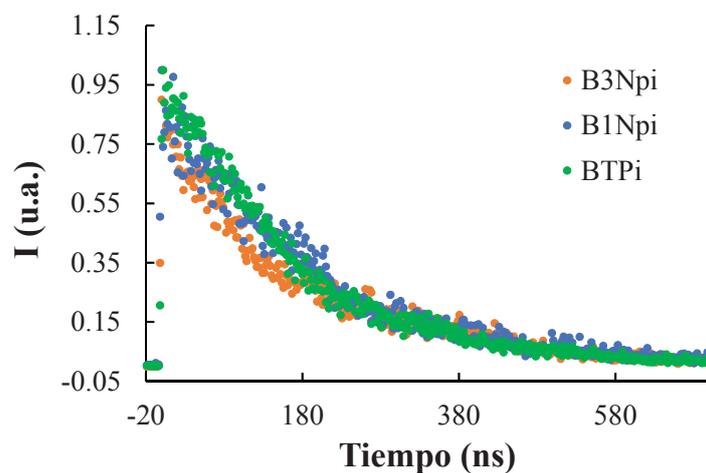


Figura 9.15. Tiempos de vida de los sistemas híbridos B1Npi (●), B3Npi (●) y BTpi (●) a pH 3, $\lambda_{\text{exc.}} = 340$ nm.

También se midieron los tiempos de vida media a pH 3, 5 y 8 para estudiar el efecto que tiene el grado de protonación en este parámetro. A modo de ejemplo en la figura 9.16 se muestran los resultados para el sistema BTpi y Tpi.

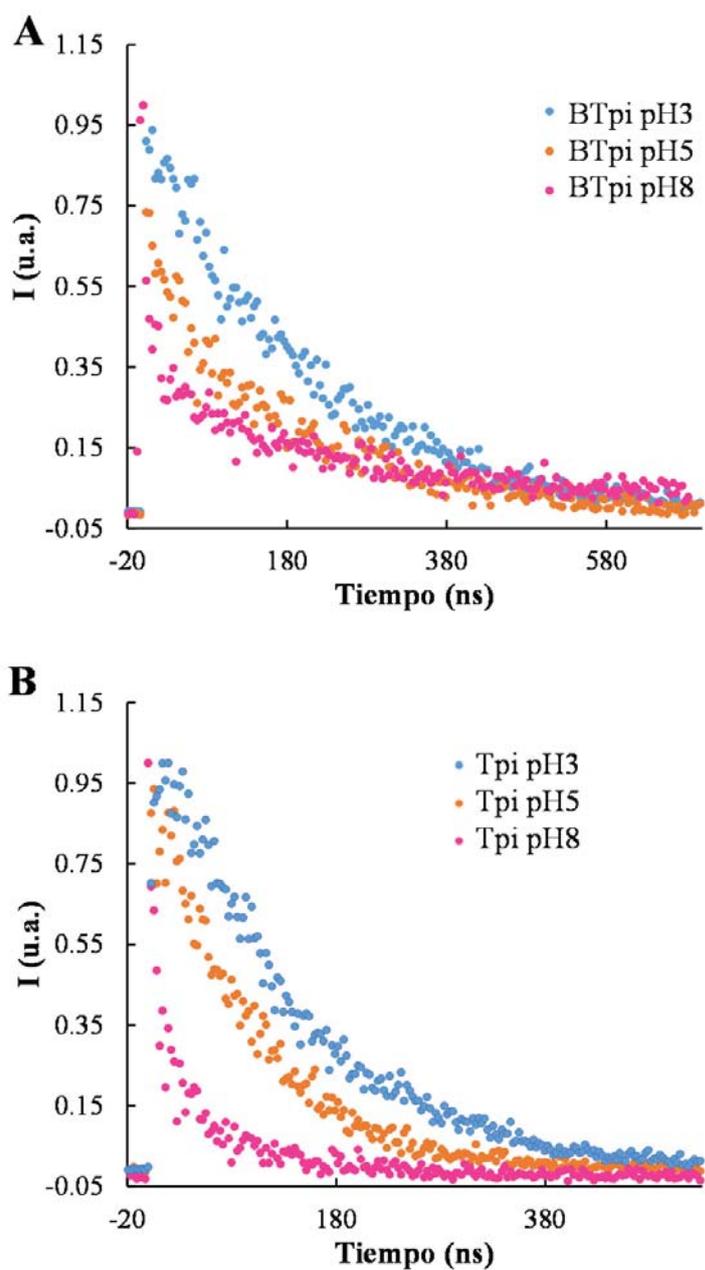


Figura 9.16. Variación de los tiempos de vida media de los sistemas BTpi (A) y Tpi (B) a diferentes pH en disolución acuosa bajo corriente de nitrógeno,

$$\lambda_{\text{exc.}} = 340 \text{ nm.}$$

En la tabla 9.3 se recogen los valores de los tiempos de vida media para todos los sistemas estudiados a los diferentes pHs. Se ha observado una disminución del valor de τ en todos los sistemas, tanto si la molécula

se encuentra libre en disolución o soportada en las nanopartículas. Además, se produce una disminución del tiempo de vida de manera general a pH 8 que coincide con la desactivación de la emisión de fluorescencia mediante el mecanismo de tipo PET.

Tabla 9.3. Tiempos de vida τ (ns) para todos los sistemas estudiados a pH 3, 5 y 8 en disolución acuosa bajo corriente de nitrógeno.

	pH = 3	pH = 5	pH = 8
Tpi	138 ± 1	180 ± 9	51 ± 3
BTpi	127 ± 2	139 ± 6	102 ± 2
B3Npi	136 ± 1	130 ± 2	123 ± 2
B1Npi	159 ± 3	173 ± 3	92 ± 4

En cuanto a la cinética de la desactivación de fluorescencia, en todos los casos los resultados se ajustan a una desactivación de primer orden. Además, al soportar los ligandos en la superficie de la bohemita, se produce un aumento en la velocidad de desactivación no radiativa respecto a los ligandos no soportados. De nuevo, este efecto es máximo para el sistema B1Npi donde la longitud de la cadena poliamínica es menor. El resultado global es una disminución del rendimiento cuántico como se ha comentado previamente.

Por último se realizaron medidas mediante la técnica denominada *flash* fotólisis en las que se irradiaron disoluciones de Tpi y BTpi a 355 nm con un láser. Con esta técnica es posible excitar a los electrones a niveles

energéticos superiores y ver la formación de especies de transición. En la figura 9.17 se muestran los resultados para el sistema Tpi. Las medidas se realizaron a pH = 2 con un tiempo de retardo de 50 ns bajo atmósfera de nitrógeno (A) y bajo atmósfera saturada de oxígeno (B). Se observan dos especies diferentes que se pueden asignar al estado $^3\pi^*$ ($\lambda_{\max} = 420 \text{ nm}$) y π^+ ($\lambda_{\max} = 460 \text{ nm}$) consistentes con la literatura.²⁶

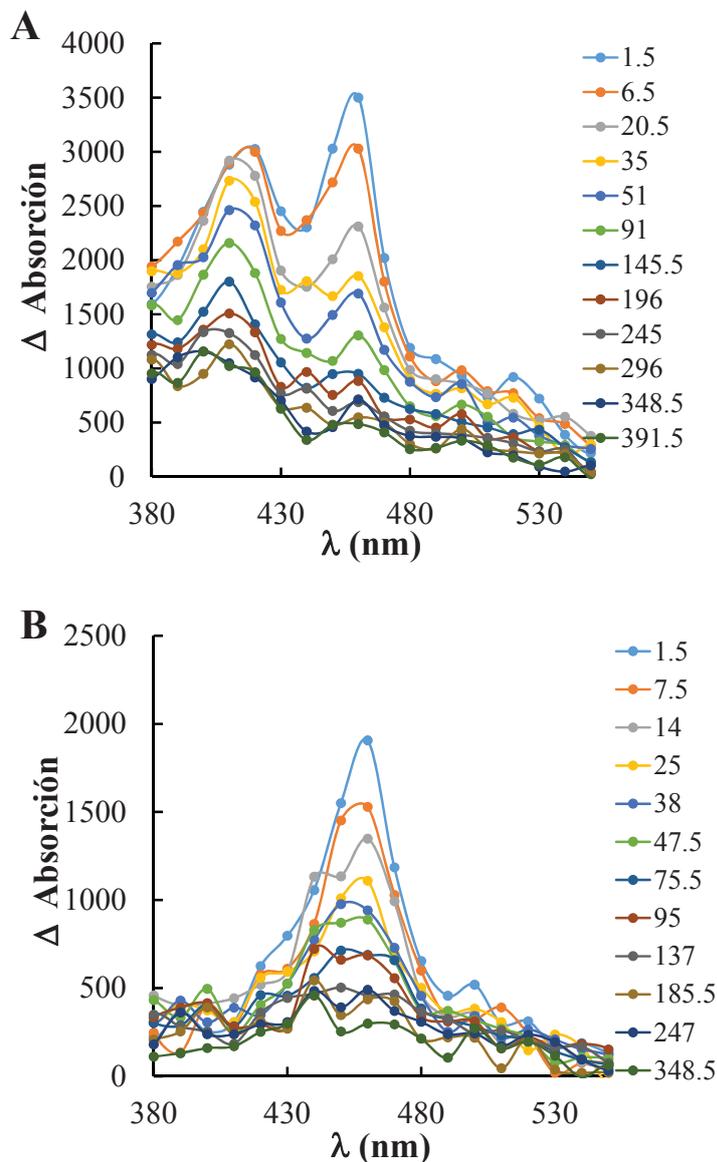


Figura 9.17. Medidas de *flash* fotólisis obtenidas para el Sistema Tpi en agua a pH 2 en atmósfera de N_2 (A) y de O_2 (B).

9.5. Reconocimiento aniónico.

Una vez que se conoce el comportamiento fotoquímico de los sistemas que se han preparado, se ha estudiado su habilidad para detectar aniones haluro y/o aniones sulfato y fosfato en disolución acuosa. A partir de la respuesta fluorescente de los diferentes sistemas en función del pH, se ha decidido realizar el estudio de reconocimiento aniónico a pH 3 manteniendo la temperatura constante a 298.1 ± 0.1 K. Los aniones que se han estudiado han sido fluoruro, cloruro, bromuro y yoduro.

En la figura 9.18 se representan los cambios producidos en la emisión de fluorescencia del receptor B1Npi conforme se adicionan cantidades crecientes de fluoruro y yoduro. La adición de fluoruro no afecta a la intensidad del espectro de emisión. Por el contrario, cuando se adiciona yoduro a una dispersión de nanopartículas de B1Npi, se produce una disminución significativa de la emisión de fluorescencia. Los experimentos que se muestran en la figura 9.18 se han llevado a cabo para el resto de los haluros además de los aniones sulfato y fosfato.

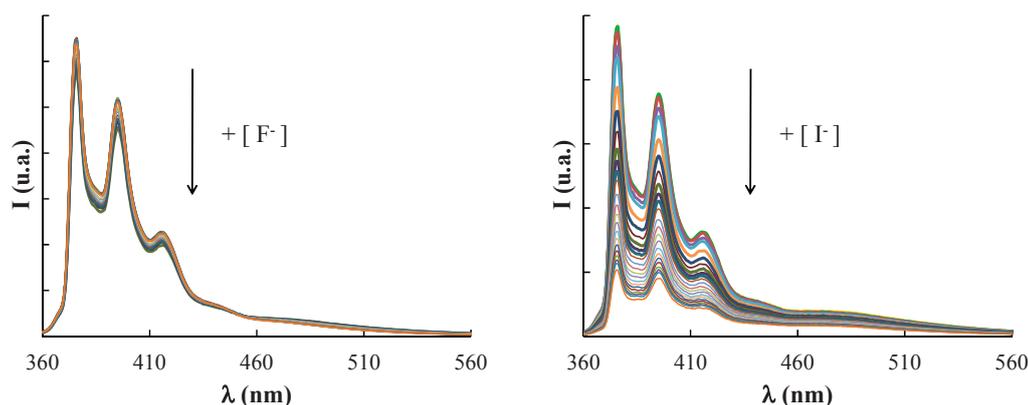


Figura 9.18. Espectros de emisión de fluorescencia del sistema B1Npi en presencia de cantidades crecientes de fluoruro y yoduro en disolución acuosa a $\text{pH} = 3$, $\lambda_{\text{exc.}} = 340$ nm.

En la figura 9.19 se muestra el máximo de emisión de fluorescencia del sistema B1Npi (normalizado frente a la emisión del sistema sin anión), frente a la adición de los diferentes aniones para ver cuáles son capaces de modificar la respuesta fotoquímica del receptor híbrido. Se puede observar que únicamente el yoduro es capaz de producir cambios en la emisión de fluorescencia.

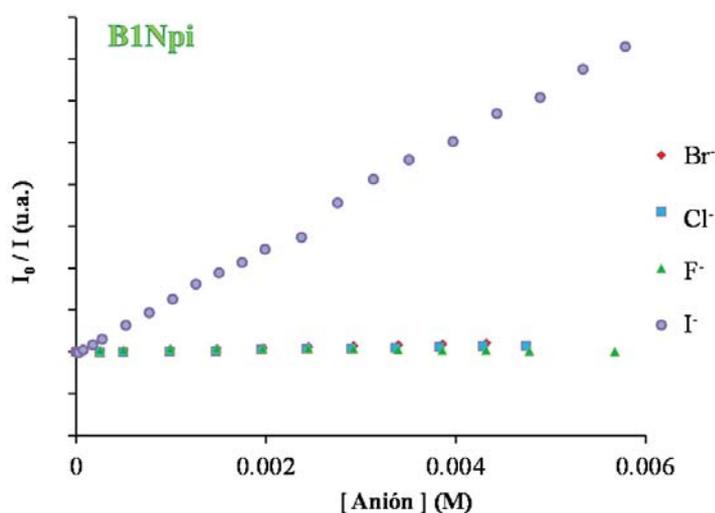


Figura 9.19. Representación del máximo de emisión de fluorescencia de los sistemas B1Npi (I_0/I) frente a la adición de cantidades crecientes de diferentes aniones a pH 3, $\lambda_{exc.} = 340$ nm y $\lambda_{emis.} = 374$ nm.

Se han realizado las mismas valoraciones para el resto de sistemas sintetizados y en todos ellos únicamente se ha observado una desactivación de la fluorescencia frente a la presencia de yoduro (figura 9.20 y 9.21).

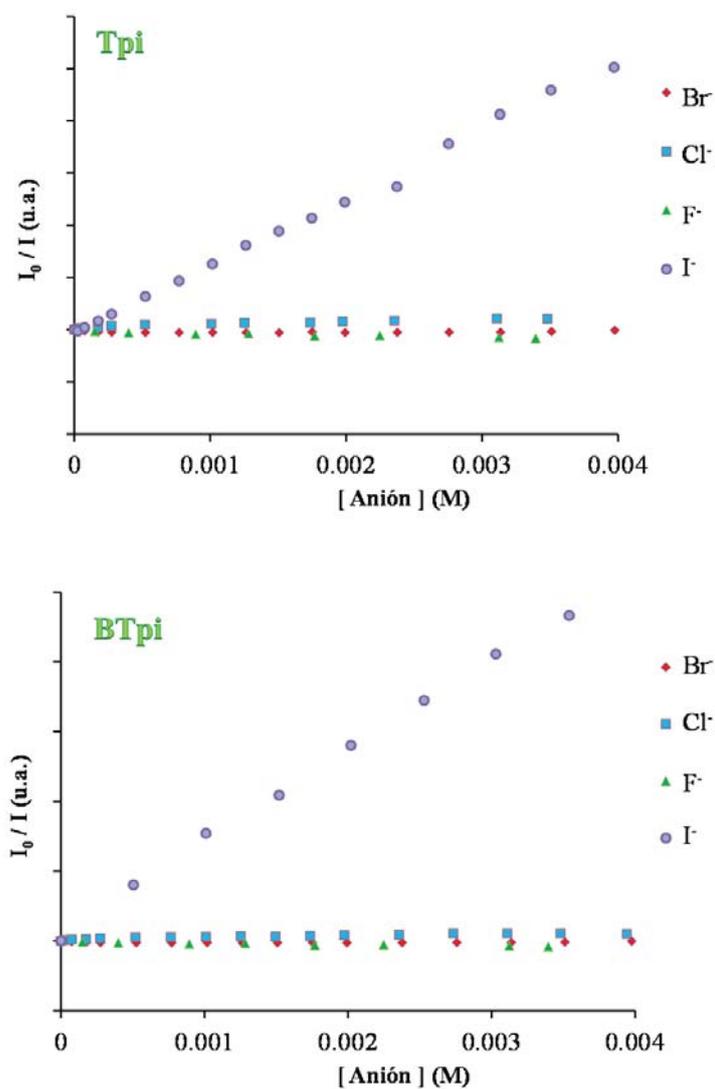


Figura 9.20. Representación del máximo de emisión de fluorescencia de los sistemas Tpi y BTpi (I_0/I) frente a la adición de cantidades crecientes de diferentes aniones a pH 3, $\lambda_{exc.} = 340$ nm y $\lambda_{emis.} = 374$ nm.

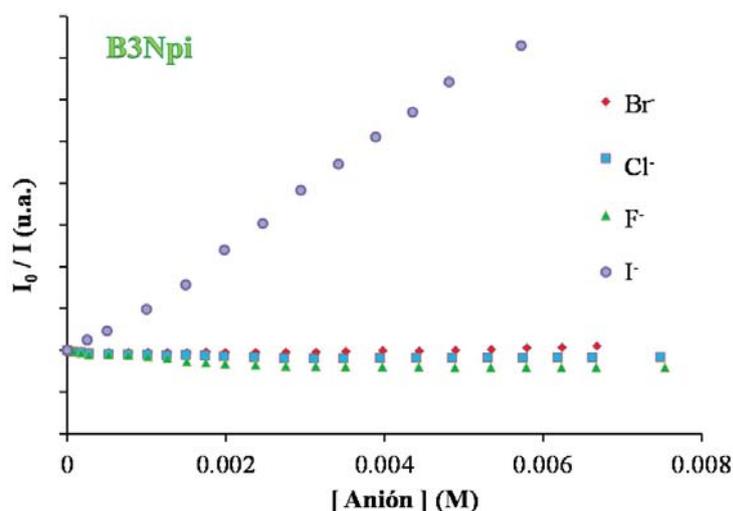


Figura 9.21. Representación del máximo de emisión de fluorescencia del sistema B3Npi (I_0/I) frente a la adición de cantidades crecientes de diferentes aniones a pH 3, $\lambda_{exc.} = 340$ nm y $\lambda_{emis.} = 374$ nm.

En la figura 9.1 se ha comentado la variedad de mecanismos que pueden explicar un proceso de desactivación de la fluorescencia. En el caso de los iones haluro (así como los *pseudohaluros* y algunos metales pesados), la desactivación de la fluorescencia ocurre como resultado de un proceso de cruce intersistema desde un estado excitado singlete a un estado excitado triplete por contacto con el anión. La vuelta al estado fundamental desde un estado triplete suele ser lenta, por lo que la relajación se puede dar mediante procesos no radiativos, mediante procesos radiativos como la fosforescencia o puede ser desactivada por la presencia de una molécula desactivadora (figura 9.22).

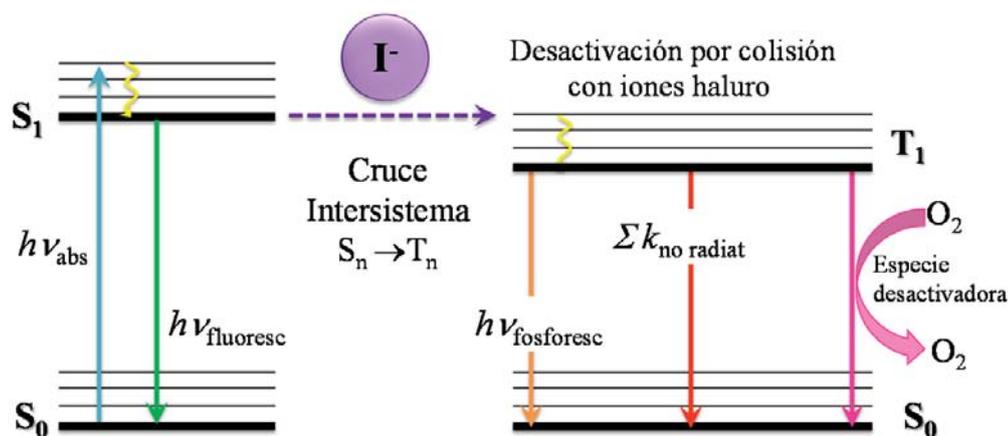


Figura 9.22. Diagrama de Jablonski modificado que muestra la desactivación por la presencia de haluros. La vuelta al estado fundamental desde el estado triplete puede suceder a través de procesos radiativos (naranja), no radiativos (rojos) o desactivación por la presencia de una especie desactivadora.

En base a los resultados obtenidos hasta ahora, se puede decir que el yoduro actúa como un sustrato desactivador (Q) de la emisión de fluorescencia del pireno. Sin embargo y tal como se vio en la introducción (apartado 1.2) existen dos posibilidades. En el caso de una desactivación estática, los fluoróforos presentes en la disolución forman complejos con la especie desactivadora (Q) en el estado fundamental y esta asociación puede inducir cambios en las propiedades del fluoróforo de manera que no se produce la posterior desactivación radiativa. Otra posibilidad es la desactivación dinámica donde la vuelta al estado fundamental se produce por colisión entre el estado excitado y la especie Q. Este proceso está controlado por la rapidez con que Q puede difundirse a través de la disolución y colisionar con el estado excitado del fluoróforo. Para estudiar el tipo de desactivación que tiene lugar en nuestros sistemas se recurre a la ecuación de Stern-Volmer (ecuación 9.2 y 9.3).

$$\frac{I_0}{I} = 1 + k_Q \tau_0 [Q] = 1 + K_{SV} [Q] \quad (\text{ec. 9.2})$$

$$K_{SV} = k_Q \tau_0 \quad (\text{ec. 9.3})$$

Donde I_0 e I son las intensidades de fluorescencia en ausencia y en presencia de Q respectivamente, k_Q es la constante que describe la velocidad de desactivación bimolecular y τ_0 es el tiempo de vida media en ausencia de Q .

En la figura 9.23 se muestran los cambios en la emisión de fluorescencia del sistema B3Npi frente a la adición de cantidades crecientes de KI. Si representamos I_0/I frente a la cantidad de anión añadido se pueden ajustar los valores experimentales a la ecuación de una recta. La ordenada en el origen es próxima a la unidad y la pendiente de la recta es la constante de Stern-Volmer K_{SV} .

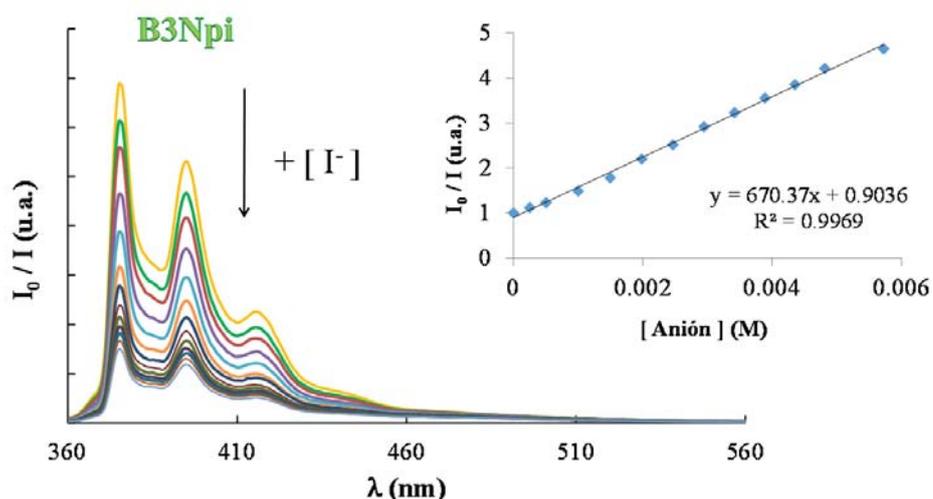


Figura 9.23. Cambios en la emisión de fluorescencia del sistema B3Npi frente a la adición de cantidades crecientes de KI en disolución acuosa a pH 3 ($\lambda_{exc.} = 340$ nm y $\lambda_{emis.} = 374$ nm). Inserción: I_0/I frente a la $[I^-]$.

Las variaciones en la emisión de fluorescencia y el cálculo de las constantes de Stern-Volmer para los sistemas B1Npi, BTpi y Tpi se muestran en las figuras 9.24, 9.25 y 9.26 respectivamente. Los resultados obtenidos para los sistemas que tienen poliaminas de cadena abierta se parecen entre sí y son bastante menores que los sistemas en los que se ha empleado la cadena tripodal, por lo que parece que mientras que el número de átomos dadores no parece influir en el mecanismo de desactivación de la fluorescencia, sí tiene importancia la topología de la molécula orgánica.

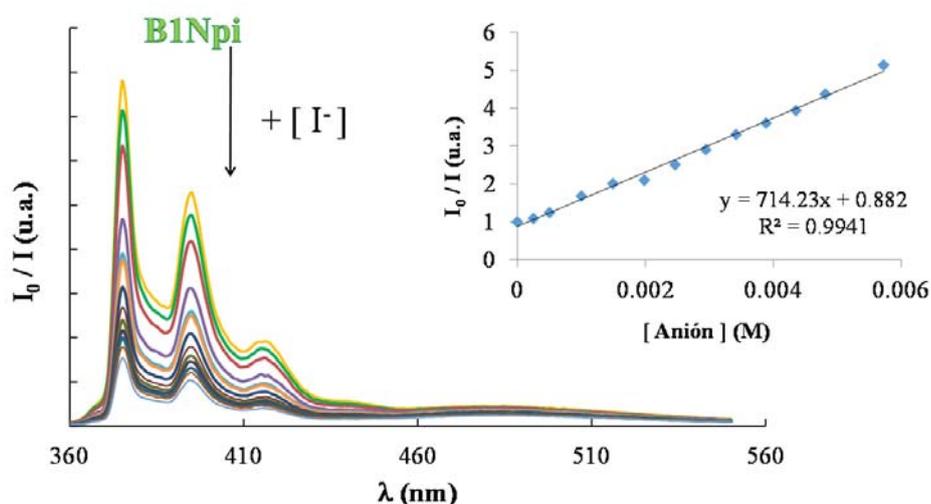


Figura 9.24. Cambios en la emisión de fluorescencia del sistema B1Npi frente a la adición de cantidades crecientes de KI en disolución acuosa a pH 3 ($\lambda_{\text{exc.}} = 340$ nm y $\lambda_{\text{emis.}} = 374$ nm). Inserción: I_0/I frente a la $[I^-]$.

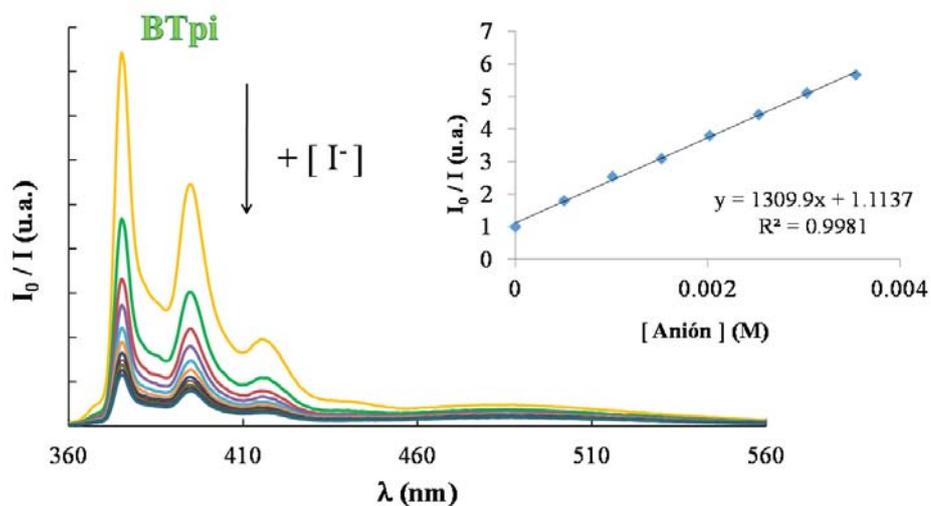


Figura 9.25. Cambios en la emisión de fluorescencia del sistema BTpi frente a la adición de cantidades crecientes de KI en disolución acuosa a pH 3 ($\lambda_{exc.} = 340$ nm y $\lambda_{emis.} = 374$ nm). Inserción: I_0/I frente a la $[I^-]$.

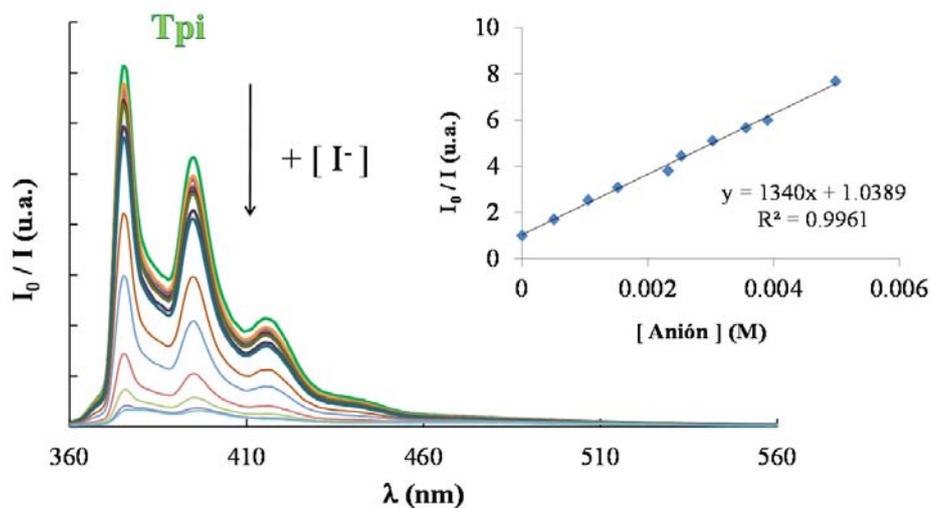


Figura 9.26. Cambios en la emisión de fluorescencia del sistema Tpi frente a la adición de cantidades crecientes de KI en disolución acuosa a pH 3 ($\lambda_{exc.} = 340$ nm y $\lambda_{emis.} = 374$ nm). Inserción: I_0/I frente a la $[I^-]$.

Al pH de trabajo, todos los grupos amino se encuentran protonados y la presencia de interacciones electrostáticas entre las cargas positivas, localizadas en los grupos amino, y los aniones yoduro puede favorecer el mecanismo de desactivación por colisión.

Para obtener más información sobre el mecanismo de desactivación que el yoduro provoca en los sistemas sintetizados se midieron los tiempos de vida en presencia del anión (figura 9.27 y 9.28). Es importante destacar que no sólo disminuye la emisión de fluorescencia en presencia de yoduro, sino que también se observa una disminución de los tiempos de vida en todos los casos, como se puede ver en la tabla 9.4.

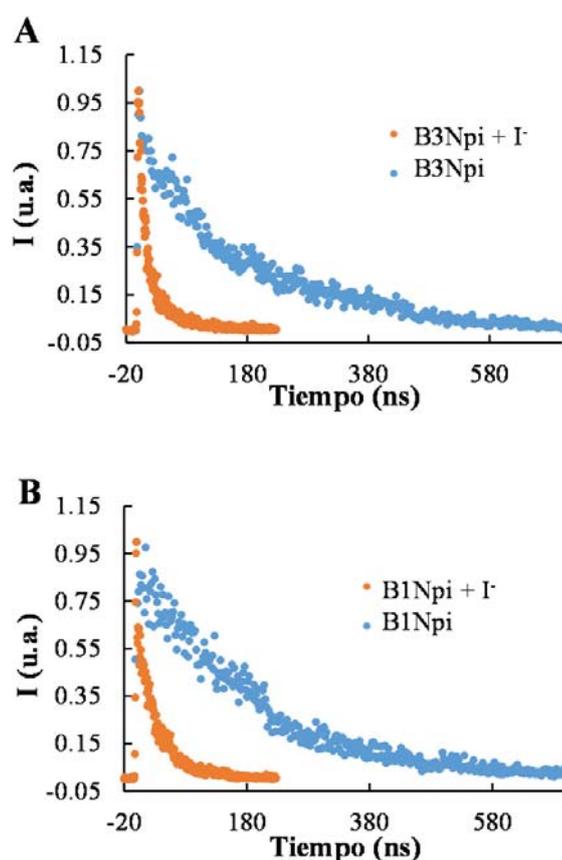


Figura 9.27. Tiempos de vida de los sistemas B3Npi (A), B1Npi (B) en ausencia y en presencia de KI a pH 3 bajo corriente de nitrógeno, [KI] = 0.005M,

$$\lambda_{\text{exc.}} = 340 \text{ nm.}$$

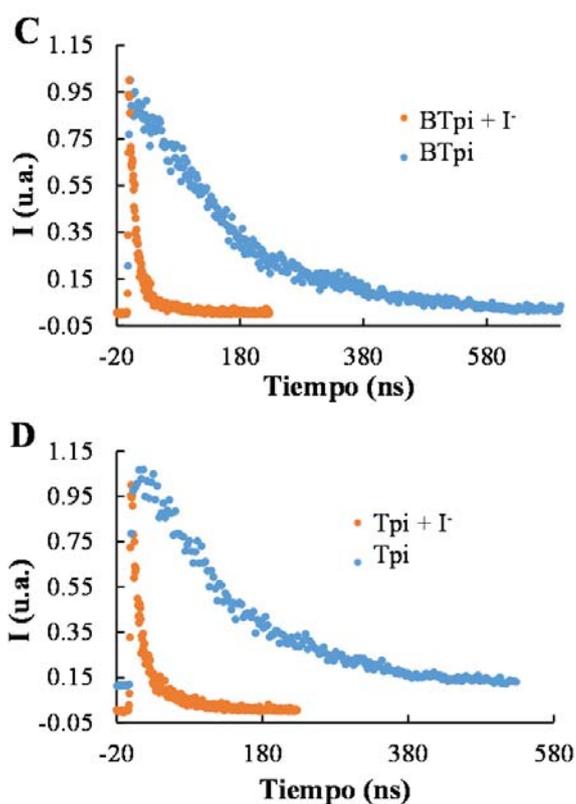


Figura 9.28. Tiempos de vida de los sistemas BTpi (C) y Tpi (D) en ausencia y en presencia de KI a pH 3 bajo corriente de nitrógeno, [KI] = 0.005M,

$$\lambda_{exc.} = 340 \text{ nm.}$$

Tabla 9.4. Constantes de Stern-Volmer, constantes de velocidad del proceso de desactivación y tiempos de vida en presencia y en ausencia de yoduro a pH 3, [KI] = 0.005 M.

	τ_0 (ns) ^a	K_{SV} (M ⁻¹)	τ (ns)	$k_Q \times 10^9$ (M ⁻¹ s ⁻¹)
Tpi	138 ± 1	1340	14 ± 3	9.7
BTpi	127 ± 2	1310	9 ± 1	10.3
B3Npi	136 ± 1	670	12 ± 2	4.9
B1Npi	159 ± 3	714	21 ± 1	4.5

[KI] = 0.005M, ^a $K_{SV} = 89.6 \text{ M}^{-1}$ para el pireno en acetonitrilo en presencia de KI.²⁷

Una vez que se conocen las constantes de Stern-Volmer y los tiempos de vida en ausencia y en presencia de yoduro, es posible conocer la constante de velocidad de desactivación bimolecular (k_Q) (tabla 9.4). Los valores de k_Q obtenidos para los sistemas en los que se ha empleado una poliamina tripodal son del orden de $10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Estos valores son típicos de un mecanismo de desactivación dinámico.

En el caso de los sistemas en los que se ha anclado una cadena poliamínica abierta se han encontrado valores de constantes de velocidad inferiores. Esta disminución en los valores de k_q puede ser debida a que el yoduro tiene una menor accesibilidad a las unidades de pireno presentes en la molécula orgánica cuando se tienen cadenas acíclicas. Sin embargo, el hecho de que en el caso de la cadena tripodal se produzca una interacción entre las aminas protonadas y el anión (como se ha visto en el diagrama de distribución de especies del sistema Tpi-yoduro) facilita que el yoduro esté más próximo a las unidades de pireno y por lo tanto que la desactivación por colisión se vea favorecida. De nuevo, la topología de la molécula orgánica juega un papel importante en el proceso de reconocimiento de yoduro en la disolución.

Por lo tanto, dado que existe cierta interacción entre la cadena poliaminica tripodal y el yoduro en el estado fundamental, no se puede excluir de forma definitiva una contribución estática al mecanismo de desactivación del pireno. De manera general se ha establecido que una combinación de ambos mecanismos (desactivación dinámica y estática) produce una curvatura en la representación de la gráfica de Stern-Volmer. Sin embargo, existen ejemplos en los que la curvatura es apenas apreciable.²⁸ En estos casos la relación $\Phi_0/\Phi = \tau_0/\tau$ no se puede aplicar. Por

ejemplo, para el sistema BTpi $\Phi_0/\Phi = 7$ y $\tau_0/\tau = 14$ lo que refuerza la idea de que existe cierta complejación en el estado fundamental.

Para poder corroborar esa posible interacción entre el Tpi y el yoduro en disolución acuosa, se realizaron estudios de complejación mediante potenciometría. En la figura 9.29 se muestra el diagrama de distribución de especies para el sistema Tpi donde se puede ver que a pH 3 se forma cierta cantidad de complejo Tpi-yoduro, mientras que no existe prácticamente interacción para las poliaminas de cadena abierta como el 1Npi.

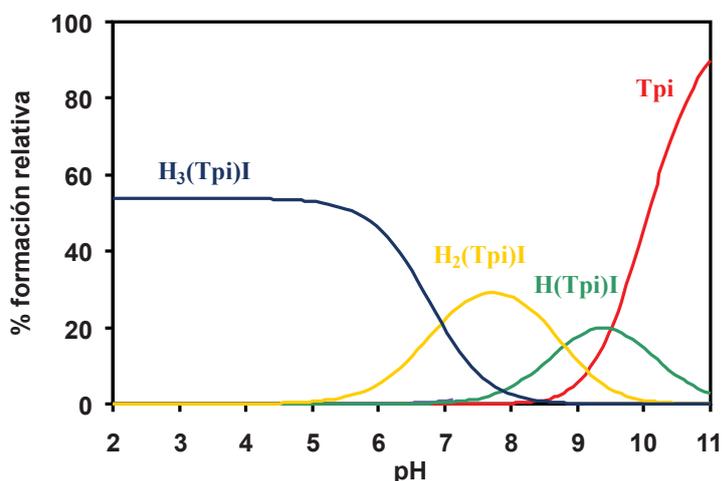


Figura 9.29. Diagrama de distribución del sistema Tpi-yoduro determinado en NaCl $0.15 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a $298.1 \pm 0.1 \text{ K}$.

Se repitieron las valoraciones de Stern-Volmer a diferentes pHs para comprobar si realmente era posible modificar el valor de la constante K_{SV} en función del grado de protonación de los grupos amino (figura 9.30). A pH 5 se en todos los sistemas estudiados. A pH básico, los grupos amino no se encuentran protonados en todos los casos, y la desactivación de la fluorescencia se produce además a través de un mecanismo de desactivación por transferencia electrónica fotoinducida (PET). Es

interesante destacar que la disminución en el valor de la constante en el caso del sistema B1Npi se produce a un pH mayor en comparación con el B3Npi. Esto se puede explicar en base al comportamiento ácido-base de los sistemas, ya que el B1Npi se desprotona a un pH mayor que el B3Npi.

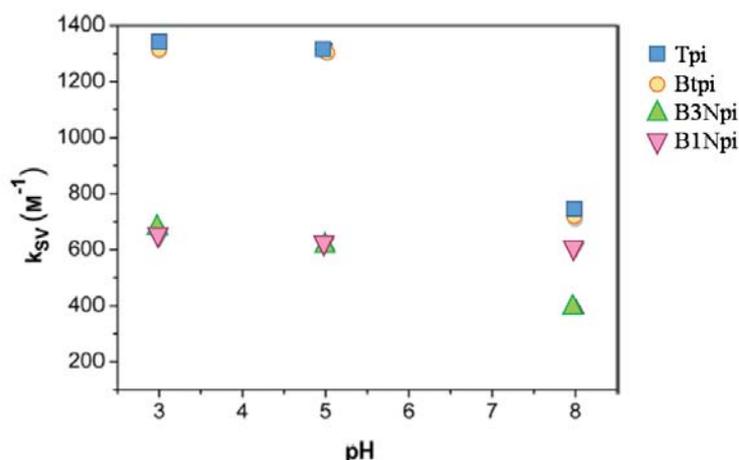


Figura 9.30. Variaciones de la constante de Stern-Volmer de los sistemas Tpi, BTpi, B3Npi y B1Npi con el pH.

Bianchi *et al.* han estudiado la interacción de la cadena tripodal tris(2-aminoetil)-amina (la misma que forma parte de los sistemas Tpi y BTpi) con diferentes aniones como el NO_3^- , SO_4^{2-} y HPO_4^{2-} mediante potenciometría.²⁹ A partir de los resultados obtenidos se ha comprobado que la cadena tripodal forma complejos con ciertos aniones incluso en disolución acuosa. Se han realizado los mismos estudios potenciométricos con el ligando Tpi para medir la interacción con sulfato, fosfato y yoduro (tabla 9.5). En todos los casos se ha observado la formación de especies $[\text{H}_p\text{LA}]^{(p-n)+}$. Aunque existe interacción con los tres aniones, cuando se han realizado las valoraciones mediante espectroscopía de fluorescencia, sólo se ha observado una disminución en la emisión de fluorescencia en el caso

del yoduro a pH 3 (figura 9.31). En el caso de la interacción con yoduro, la interacción del anión los grupos amino protonados presentes en la cadena favorece la proximidad o la accesibilidad del yoduro al pireno, haciendo que el proceso de desactivación por colisión sea más eficaz que en el caso de los sistemas que tienen una cadena acíclica dónde la interacción con el yoduro es menor.

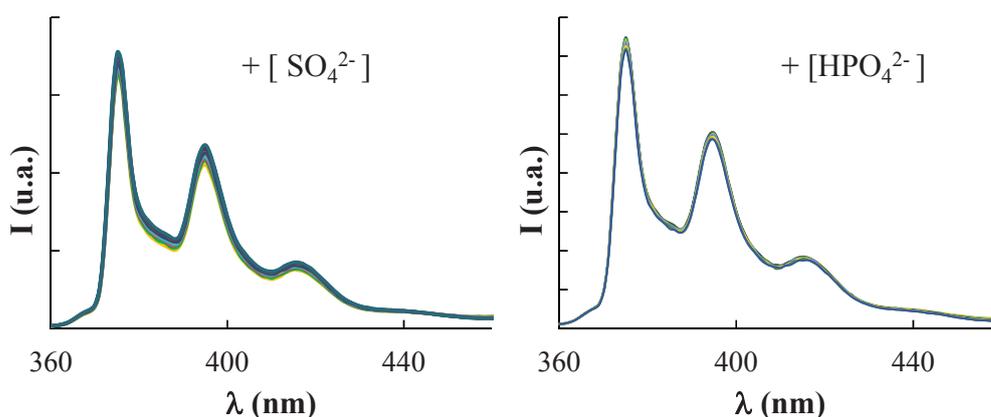


Figura 9.31. Cambios en la emisión de fluorescencia del sistema Tpi frente a la adición de cantidades crecientes de SO_4^{2-} y HPO_4^{2-} en disolución acuosa a pH 3 ($\lambda_{\text{exc.}} = 340 \text{ nm}$).

Tabla 9.5. Logaritmos de de las constantes de estabilidad para la interacción del ligando Tpi con SO_4^{2-} y HPO_4^{2-} determinados en $\text{NaCl } 0.15 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ a $298.0 \pm 0.1 \text{ K}$.

Reacción	I ⁻	SO_4^{2-}	HPO_4^{2-}
$\text{H(L1)} + \text{A} \rightleftharpoons \text{H(L1)A}^{\text{a}}$	2.35(2) ^b	2.55(2)	3.28(2)
$\text{H}_2(\text{L1}) + \text{A} \rightleftharpoons \text{H}_2(\text{L1)A}$	2.59(3)	2.73(2)	3.50(2)
$\text{H}_3(\text{L1}) + \text{A} \rightleftharpoons \text{H}_3(\text{L1)A}$	2.92(3)	3.05(2)	3.74(2)

a) Cargas omitidas. b) Los números entre paréntesis indican la desviación estándar de la última cifra significativa. L = Tpi y A = correspondiente anión estudiado.

9.5.1. Cálculo del límite de detección.

Para conocer la sensibilidad del proceso de reconocimiento de yoduro se ha medido el límite de detección (LD) para todos los sistemas. El límite de detección (LD) se define como la mínima cantidad de sustrato necesaria para producir una respuesta diferente a la del blanco, que en nuestro caso sería el sistema híbrido en ausencia de yoduro (ver apartado 4.15).³⁰ En la figura 9.32 se muestra la valoración realizada al sistema B3Npi para calcular el límite de detección.

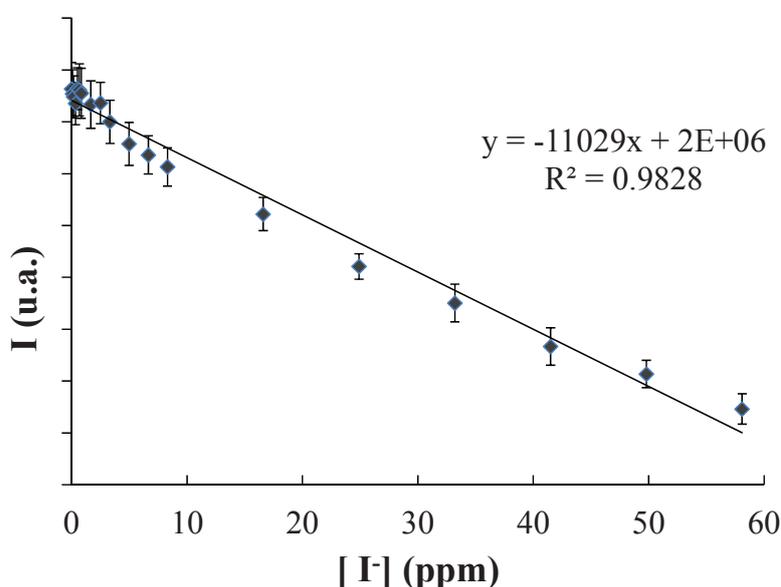


Figura 9.32. Variación de la intensidad de emisión de fluorescencia del sistema B3Npi frente a adiciones crecientes de yoduro, $\lambda_{exc.} = 3 \text{ nm}$ y $\lambda_{emis} = 374 \text{ nm}$.

Se ha estimado que los valores del límite de detección de yoduro son 45 ppb para el ligando Tpi, 36 ppb para el sistema híbrido BTpi, 58 ppb para el sistema B3Npi y 202 ppb para el sistema B1Npi. Aunque el límite de detección es algo mayor en el caso del sistema híbrido B1Npi, todos ellos están por debajo de 18 ppm, que es la máxima concentración de yoduro recomendable en el agua de consumo según la organización

mundial de la salud (OMS). Por lo tanto, se puede considerar que los sistemas híbridos sintetizados representan una clara opción en la detección de yoduro mediante fluorescencia.

9.6. Conclusiones.

Se han estudiado las propiedades fotoquímicas de varias poliaminas con diferente topología que contienen unidades de pireno en su estructura. Además de estudiar estos ligandos en disolución acuosa, se han anclado a la superficie de nanopartículas de bohemita de 15 nm de diámetro. Tanto los ligandos en su forma libre como anclados en las nanopartículas han demostrado ser selectivos para yoduro frente a otros haluros y aniones. Además se ha medido el límite de detección, obteniendo resultados muy prometedores para todos los sistemas.

A partir de los resultados fotoquímicos obtenidos se ha comprobado que la funcionalización de la superficie con los ligandos no ha llevado a la formación de excímeros por lo que las unidades de pireno se encuentran distribuidas lo suficientemente separadas entre sí para evitar la formación de interacciones por apilamiento de tipo π , que podrían llevar a la desactivación de la emisión de fluorescencia del pireno.

Se ha comprobado la importancia de la topología de la poliamina en el proceso de reconocimiento de yoduro ya que en el caso de la poliamina tripodal, la formación de aductos ligando-anión ha permitido que el proceso de desactivación por colisión sea más efectivo que en el caso de las poliaminas de cadena abierta donde no existe una interacción tan clara entre el yoduro y las aminas protonadas.

Por último, la posibilidad de recuperar el quimiosensor híbrido al aumentar el pH mediante la centrifugación del gel formado, o la posibilidad de preparar columnas rellenas con los sistemas híbridos para trabajar en modo continuo, añade una ventaja más al empleo de nanopartículas funcionalizadas en el campo del reconocimiento en disolución acuosa.

9.7. Bibliografía.

-
- [1] B. Ma, F. Zeng, F. Zheng, S. Wu, *Chem. Eur. J.*, 2011, 17, 14844.
- [2] B. S. Hetzel, *World Health Organization* 2002, 80, 410.
- [3] a) D. Y. Lee, N. Singh, M. J. Kim, D. O. Jang, *Org. Lett.* 2011, 13, 3024. b) M. Vetrichevan, R. Nagarajan, S. Valiyaveetil, *Macromolecules* 2006, 39, 8303.
- [4] A. K. Singh and S. Mehtab, *Talanta*, 2008, 74, 806.
- [5] a) Y. Bichsel, U. von Gunten, *Anal. Chem.*, 1999, 71, 34. b) L. Fernández-Sánchez, J. Szpunar, *J. Anal. At. Spectrom.*, 1999, 14, 1697. c) W. Hu, P. J. Yang, K. Hasebe, P. R. Haddad and K. Tanaka, *J. Chromatogr., A*, 2002, 956, 103.
- [6] a) K. Ito, T. Ichihara, H. Zhuo, K. Kumamoto, A. R. Timerbaev, T. Hirokawa, *Anal. Chim. Acta*, 2003, 497, 67. b) P. Pantůcková, L. Krivánková, *Electrophoresis*, 2004, 25, 1102. c) A. Nori de Macedo, K. Teo, A. Mente, M. J. McQueen, J. Zeidler, P. Poirier, S. A. Lear, A. Wielgosz, P. Britz-McKibbin, *Anal. Chem.*, 2014, 86, 10010.
- [7] a) P. Bermejo-Barrera, L. M. Fernández-Sánchez, M. A. Somoza, R. M. Anllo-Sendin, A. Bermejo-Barrera, *Microchem. J.*, 2001, 69, 205. b) M. C. Yebra, R. M. Cespón, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 2000, 367, 24.
- [8] a) H. Kim, J. Kang, *Tetrahedron Lett.*, 2005, 46, 5443. b) N. Singh, D. O. Jang, *Org. Lett.*, 2007, 9, 1991. c) S. Nabavi, N. Alizadeh, *Sens. Actuators B Chem.*, 2014, 200, 76.

[9] a) A. K. Mahapatra, J. Roy, P. Sahoo, S. K. Mukhopadhyay, A. Chattopadhyay, *Org. Biomol. Chem.*, 2012, 10, 2231. b) H. J. Jung, N. Singh, D. Y. Lee, D. O. Jang, *Tetrahedron Lett.*, 2010, 51, 3962. c) B. Ma, F. Zeng, S. Wu, *Chem. Eur. J.*, 2011, 17, 14844. c) P. A. Gale, *Chem. Soc. Rev.*, 2010, 39, 3746. d) S. Kubik, *Chem. Soc. Rev.*, 2010, 39, 3648.

[10] a) R. C. Mayrhofer, T. A. Betts, *Abstr. Papers Am. Chem. Soc.* 216 125-ched. b) C. D. Geddes, P. Douglas, C. P. Moore, T. J. Wear, P. L. Egerton, *J. Fluoresc.*, 1999, 9, 163. c) C. D. Geddes, K. Apperson, D. J. S. Birch, *Anal. Biochem.*, 2001, 293, 60.

[11] a) P. K. Behera, A. K. Mishra, *J. Photochem. Photobiol. A*, 1993, 71 115. b) P. K. Behera, T. Mukherjee, A. K. Mishra, *J. Lumin.*, 1995, 65, 131.

[12] T. Moriya, *Bull. Chem. Soc. Japan*, 1984, 57, 1723.

[13] C. D. Geddes, *Dyes Pigments*, 2000, 45, 243.

[14] a) G. A. Davis, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1973, 728. b) S. Carrigan, S. Doucette, C. Jones, C. J. Marzzacco, A. M. Halpern, *J. Photochem. Photobiol. A*, 1996, 99, 29. c) R. S. Sarpal, S. K. Dogra, *Indian J. Chem. A*, 1994, 33, 111.

[15] a) D. Martínez-Oteroa, J. Barroso-Flores, A. K. Yatsimirsky, A. Dorazco-González, *Sensors And Actuators B*, 2015, 221, 1348. b) M. M. Watt, J. M. Engle, K. C. Fairley, T. E. Robitshek, M. M. Haley, D. W. Johnson, *Org. Biomol. Chem.*, 2015, 13, 4266. c) P. Aroraa, K. Suyala, N. K. Joshia, H. C. Joshib, S. Pant, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2012, 94, 119. d) V. Kumara, M. P. Kaushika, A. K. Srivastavaa, A. Pratapa, V. Thiruvenkatamb, T. N. G. Row, *Anal. Chim. Acta*, 2010, 663, 77. e) Y. Zhao, L. Yao, M. Zhang, Y. Ma, *Talanta*, 2012, 97, 343. f) H. Wang, L. Xue, H. Jiang, *Org. Lett.*, 2011, 13, 3844. g) J. S. Kim, S. Y. Park, S. H. Kim, P. Thuéry, R. Souane, S. E. Matthews, *J. Vicens, Bull. Korean Chem. Soc.*, 2010, Vol. 31, 624.

[16] a) L. Prodi, *New J. Chem.*, 2005, 29, 20. b) T. Asefa, C. T. Duncanc, K. K. Sharma, *Analyst*, 2009, 134, 1980. b) A. Chen, S. Chatterjee, *Chem. Soc. Rev.*, 2013, 42, 5425.

[17] a) N. Touisni, N. Kanfar, S. Ulrich, P. Dumy, C. T. Supuran, A. Mehdi, J.-Y. Winum, *Chem. Eur. J.*, 2015, 21, 10306. b) S. Hong, P. R. Leroueil, I. J. Majoros, B. G. Orr, J. R. Baker Jr., M. M. B. Holl, *Chemistry & Biology*, 2007, 14, 107. c) R. Hennig, K. Pollinger, A. Vesper, M. Breunig, A. Goepferich, *J. Control. Release*, 2014, 194, 20. d) J. Wang, S. Tian, R. A. Petros, M. E. Napier, J. M. DeSimone, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, 132, 11306. e) F. G. Brunetti, H. Isla, J. Aragón, E. Ortí, E. M. Pérez, N. Martín, *Chem. Eur. J.*, 2013, 19, 9843.

[18] A. G. Algarra, M. G. Basallote, C. E. Castillo, M. P. Clares, A. Ferrer, E. García-España, J. M. Llinares, M. A. Máñez, C. Soriano, *Inorg. Chem.*, 2009, 48, 902.

[19] F. Pina, J. C. Lima, C. Lodeiro, J. Seixas de Melo, P. Díaz, M. T. Albelda, E. García-España, *J. Phys. Chem. A.*, 2002, 106, 8207.

[20] L. Alderighi, P. Gans, A. Ienco, D. Peters, A. Sabatini, A. Vacca, *Coord. Chem. Rev.*, 1999, 184, 311.

[21] a) C. Frassinetti, S. Ghelli, P. Gans, A. Sabatini, M. S. Moruzzi, A. Vacca, *Anal. Biochem.*, 1995, 231, 374. b) S. P. Dagnall, D. N. Hague, M. E. McAdam, A. D. Moreton, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1*, 1985, 81, 1483. c) D. N. Hague, A. D. Moreton, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 1994, 265.

[22] C. Frassinetti, L. Alderighi, P. Gans, A. Sabatini, A. Vacca, S. Ghelli, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2003, 376, 1041.

[23] a) A. Nakajima, *Bull. Chem. Soc. Japan*, 1971, 44, 3272. b) D. S. Karpovich, G. J. Blanchard, *J. Phys. Chem.*, 1995, 99, 3951. c) K. P. Geigle, J. Wol, G. Hohlneicher, *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry*, 1997, 105, 183. d) A. Nakajima, *Spectrochim. Acta.*, 1982, 38A, 693. e) K. Kalyanasundaram, J. K. Thomas, *J. Am. Chem. Soc.*, 1977, 99, 2039. f) K. Hara, W. Ware, *Chem. Phys.*, 1980, 51, 61.

[24] J. Alarcón, M. T. Albelda, R. Belda, M. P. Clares, E. Delgado-Pinar, J. C. Frías, E. García-España, J. González, C. Soriano, *Dalton Trans.*, 2008, 6530.

[25] S. A. Ruetten, J. K. Thomas, *J. Phys. Chem. B*, 1998, 102, 598.

[26] a) A. Corma, M. S. Galletero, H. García, E. Palomares, F. Rey, Chem. Commun., 2002, 1100. b) S. Hashimoto, Chem. Phys. Lett., 1996, 252, 236.

[27] L. Li, Z. Zhang, W. Long, A. Tong, Spectrochim. Acta, Part A, 2001, 57, 385.

[28] M. Perry, C. Carra, M. N. Chrétien, J. C. Scaiano, J. Phys. Chem. A, 2007, 111, 6.

[29] C. Bazzicalupi, A. Bencini, A. Bianchi, A. Danesi, C. Giorgi, B. Valtancoli, Inorg. Chem., 2009, 48, 2391.

[30] N. Gimeno, X. Li, J. R. Durrant, R. Vilar, Chem. Eur. J., 2008, 14, 3006.

10.

Summary and conclusions.



Note: This chapter has intentionally been written in English in order to obtain the european doctoral degree.

Nota: Este capítulo ha sido escrito en inglés para la obtención del doctorado europeo.

Supramolecular chemistry has been defined as “the chemistry beyond the molecule”. Intermolecular noncovalent bonds are the driving forces for constructing highly complex systems by preorganization of the molecular components. Suitable functionalized receptors may display molecular recognition as well as supramolecular reactivity, catalysis and selective transport processes.

The knowledge developed in this field has allowed the researchers to go a step forward in the design and generation of well-defined, functional molecular and supramolecular architectures of nanometric size through self-organization of the receptors. In this sense, the advances in nanotechnology have provided a variety of nanostructured materials with highly controlled and exceptional properties. The discovery of novel materials, processes, and phenomena at the nanoscale and the development of new experimental and theoretical techniques for research provide fresh opportunities for the development of innovative nanosystems and nanostructured materials. The properties of materials at the nanoscale can be very different from those at a larger scale. Among these materials, nanoparticles exhibit an intense interest because of their unique optical, electronic, magnetic, catalytic, and other physical properties arising from the chemical composition of the material and the nanometer dimensions.

The synergistic effect achieved by the organization and the structural rigidity of hosts on the solid surface is the key element for enhanced recognition of a guest, often resulting in an improved selectivity and sensitivity compared with the free, molecular hosts. The introduction of surface functionalities plays a decisive role in the development of such systems and has an important impact on the application of these hybrid materials in areas ranging from sensing to biotechnology and catalysis.

In order to achieve sensitive detection of target analytes present at trace levels, fluorescence is by far the dominant detection method in the field of sensing technology, due to its simplicity, the convenience of transducing the optical signal, the availability of organic dyes with diverse spectral properties, and the rapid advances made in optical imaging. The burst of nanotechnology, leading to the development of materials with submicron-sized dimensions and unique optical properties, has opened up new horizons for fluorescence detection.

The main aim of this thesis has been the development of synthetic procedures to attach organic molecules on the surface of boehmite nanoparticles in a well-defined, controllable, and reliable manner in order to develop nanostructured devices suitable for their application in the environmental and biomedical fields.

In the following pages the main conclusions will be outlined.

CONCLUSION 1: First of all, two kinds of nanoparticles were obtained by a sol-gel synthetic procedure. The controlled hydrolysis of an aluminium alcoxide in water gave as a result the gamma polymorph of aluminium oxohydroxide. Taking into account different parameters like the temperature of the reaction, the aluminium-water ratio and the acid chosen in the peptization process, we were able to synthesise boehmite nanoparticles with an average size between of 15-20 nm.

In addition, core-shell nanoparticles were obtained by surrounding boehmite with a thin layer of amorphous silica. The nanoparticles obtained were smaller than the others.

Both nanoparticles present a high degree of homogeneity in size and shape and they can be dispersed in pure water and carry out the spectroscopic measurements without scattering problems. Furthermore, both systems are gels at pH 12 and this feature allow us the recovering of the material by simple centrifugation procedures.

CONCLUSION 2: Boehmite-silica core-shell nanoparticles were synthesized with an average size of 10 nm. The surface was modified with simple polyamine chains containing one amino group in the case of M1NA and three amino groups in the M3NA system. Both organic molecules were also linked to an anthracene fluorophore.

Spectrofluorometric titrations were carried out to study the acid-base behaviour of the hybrid nanoparticles. In both cases, a decrease in the fluorescence emission was observed as the pH was increased. The mechanism of the quenching was a photoinduced electron transfer from the amine lone pairs to the excited fluorophore due to deprotonation of the ammonium groups.

After that, the systems were employed in the detection of Hg(II) in aqueous solution. Although both systems were able to detect the cation due to a CHEQ effect in the fluorescence response, M1NA system showed very high selectivity for sensing Hg(II) cations in aqueous solution in a pH window around 5. The remarkable efficiency and selectivity for Hg(II) at pH 5 can be ascribed to the ability of the cation to form stable complexes with low coordination numbers.

Both hybrid systems present detection limits (0.19 ± 0.01 ppb for M1NA and 0.37 ± 0.03 ppb for M3NA) that lie far below the 2 ppb limit,

which is the maximum permitted Hg(II) amount in drinking water following the USA Environmental Protection Agency (EPA) criterion.

Finally, the gelification that occurs when the pH is brought to 11 permits the recovery of the nanoparticles by a simple centrifugation procedure, which permits the use of the hybrid chemosensor several times.

CONCLUSION 3: Boehmite nanoparticles were modified with DTPA and DO3A moieties and Eu(III), Tb(III) and Gd(III) complexes were formed for both of them. The hybrid systems were able to complex lanthanide ions in aqueous solution maintaining the thermodynamic stability exhibited by the isolated organic complexes by themselves.

The big quantity of lanthanide cations located at the surface of the nanoparticles is a good example of multivalency as the Gd(III) hybrid nanoparticles provide a magnification of the signal for MRI, which could be useful to image small structures, such as cells. NMRD profiles showed the typical hump at high-fields of slowly rotating systems, while ^{17}O transverse relaxation rates reflect a fast water exchange process. Small aggregates were formed during the measurements. Therefore, some extra work can be done in order to avoid them and obtain even better relaxivity values.

We have also evaluated the optical properties of the Eu(III) and Tb(III) complexes in human HeLa cells. Confocal laser scanning microscopy showed that the nanoparticles were taken up and localized all over the cytoplasm of the cells. Flow cytometry analysis revealed that neither the isolated nanoparticles nor the modified ones produce cellular toxicity.

CONCLUSION 4: Boehmite and boehmite-silica nanoparticles were modified with organic molecules containing either a squaramide functionality or a quaternised amino group or a combination of both of them.

The signalling of anion binding has been performed by means of an indicator displacement assay (IDA) using Bromocresol Green (BG) as the dye. The colour change from yellow to blue is due to the deprotonation of the phenolic unit of BG to give a dianionic semiquinone with extended conjugation, able to be recognized by the squaramide receptor. All the studies were done in acetic buffer solution, maintaining the pH at 3.4.

From the results obtained, we have proved that the attachment of these molecular components to the nanoparticles leads to systems with reproducible responses and long durability for selectively binding of sulphate anions in pure water, which is a challenging goal in supramolecular analytical chemistry. The effective recognition of sulphate over phosphate and monovalent halide anions in pure water is based on the pH choosed to carry out the experiments since at acidic pH values phosphate anions exist in their diprotonated monovalent H_2PO_4^- form whereas sulphate still persists in solution as the divalent SO_4^{2-} anion due to its higher acidity. The same applies for the discrimination of anions derived from carboxylic acids.

Although some detection was observed also for phosphate, its extent was lower indicating an important degree of selectivity for sulphate over phosphate under the conditions of the experiment.

It has to be emphasized that neither anyone of the two component elements individually (the quaternised ammonium group and the

squaramide function) nor a combination of them lead, in the absence of the nanoparticles, to any significant interaction with these anions in pure water. The same situation occurs with the nanoparticles that were modified with a single ammonium group. Whereas the sulphate recognition by only one ammonium group is completely impossible in water, the amino modified nanoparticles were able to detect sulphate, and other anions in water at pH 3.4.

Therefore, the particles are not innocent observers in the hybrid systems, but they play a role in organizing and pre-concentrating the receptor molecules favouring likely the desolvation of the partner species.

CONCLUSION 5: Boehmite nanoparticles were modified in order to obtain a series of new chemosensors containing lineal or tripodal polyamines as a receptor unit and pyrene as the signalling unit.

We have studied the photophysical properties of the materials prepared when the ligand is supported in the boehmite surface and also we have synthesized the ligands unsupported for studying them in solution.

The maximum fluorescence emission is achieved at acidic pH, when the amino groups are fully protonated. An increment of the pH is translated in a quenching effect in the intensity of fluorescence, due to an efficient electron transfer from the lone pairs situated in the unprotonated amines to the aromatic excited state.

After that, the hybrid systems were employed in the detection of iodide in aqueous solution. From quantum yield, lifetime and Stern-Volmer measurements it can be concluded that selective fluorescence sensing systems for iodide in a wide pH range have been successfully

developed by employing a fluorescence collisional quenching. Also it has been observed that the topology of the polyamine chain plays a role in the iodide recognition. In this sense, the hybrid system containing tripodal polyamine was the most efficient chemosensor.

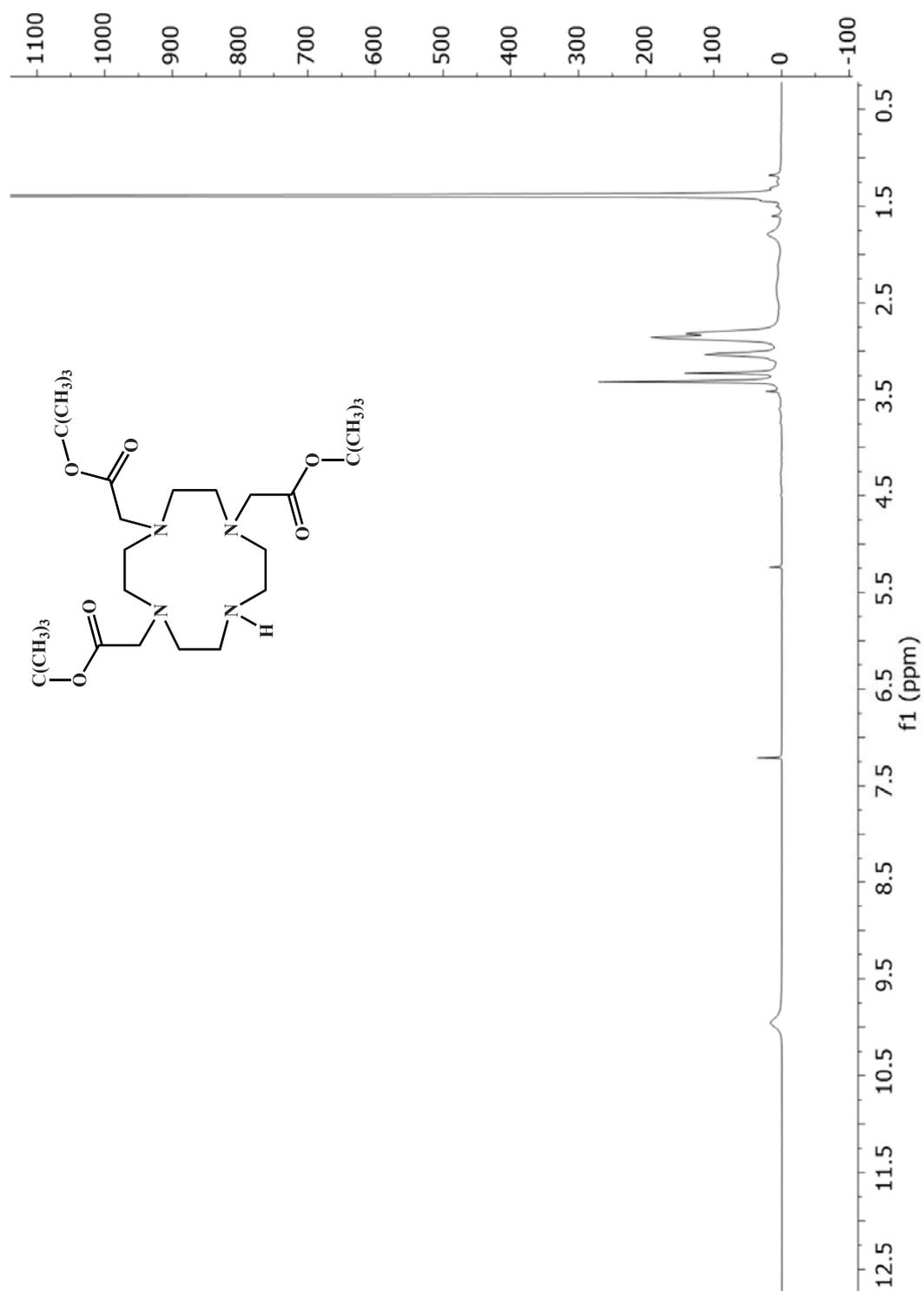
In addition, neither solutions of the free molecules nor solutions of the supported materials show excimer emission being the signal mechanism the monomer emission. We have observed just that the detection limit is lower in the supported material.

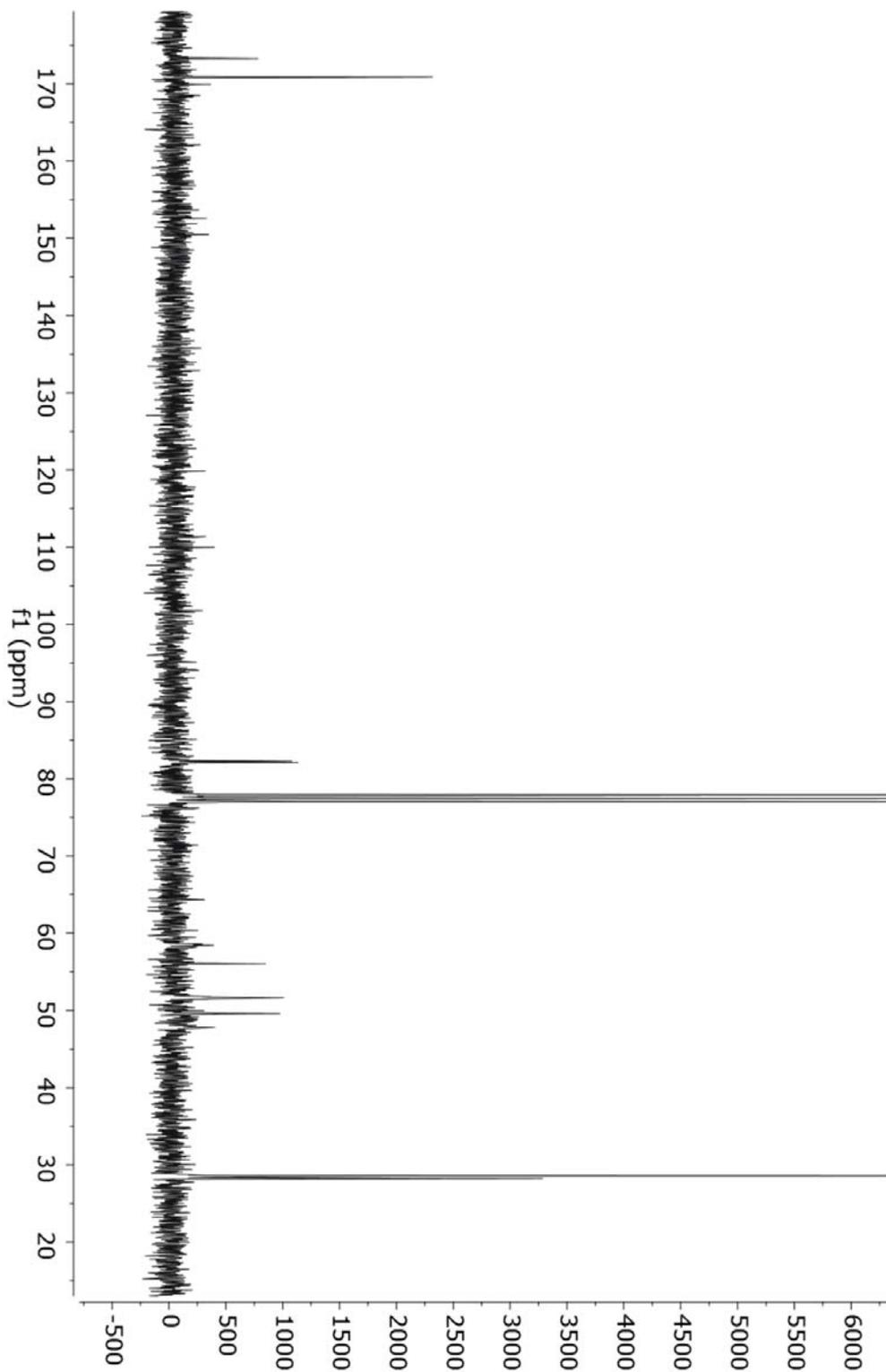
Although, it was not possible to observe an enhancement in the response of the supported materials compared with the free ligands, the possibility to recover the functionalized nanoparticles by centrifugation, or the possibility to fill a column with the nanoparticles to remove iodide anions from water, makes these systems an important alternative in the field of chemosensing iodide in water.

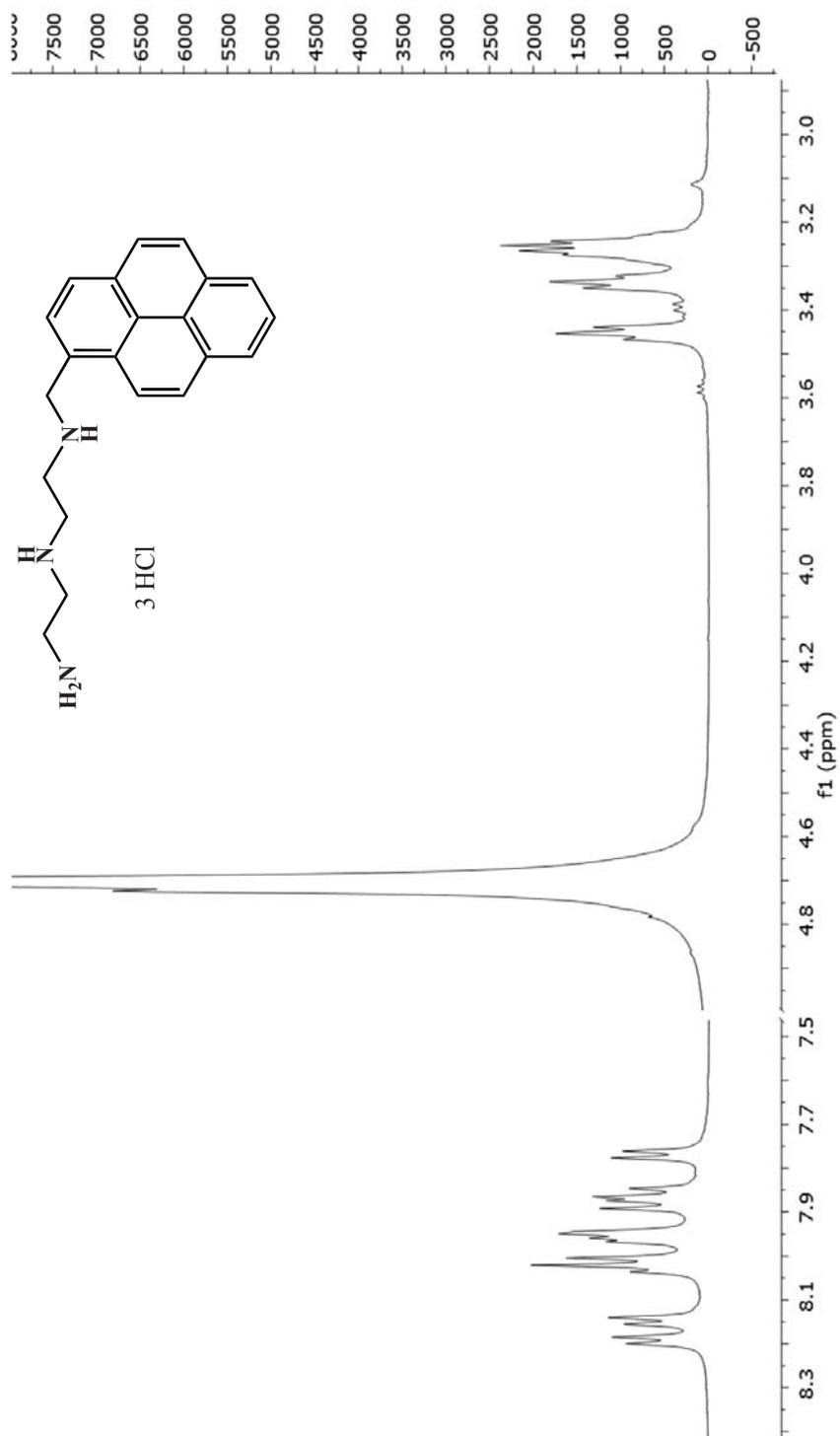
CONCLUSION 6: Finally, boehmite has emerged as a promising platform to afford the design of chemosensors able to act in a wide variety of applications encompassing from ion recognition in water to contrast agents. The combination of inertness (high stability) and low toxicity, easy synthesis, very large surface area, well established surface functionalization (generally through silane linkages) and tunable stability (going from a sol to a gel depending on the pH of the aqueous solution) provide boehmite nanoparticles with unique attributes to be used as an important alternative in the design of luminescent hybrid organic-inorganic nanostructured materials.

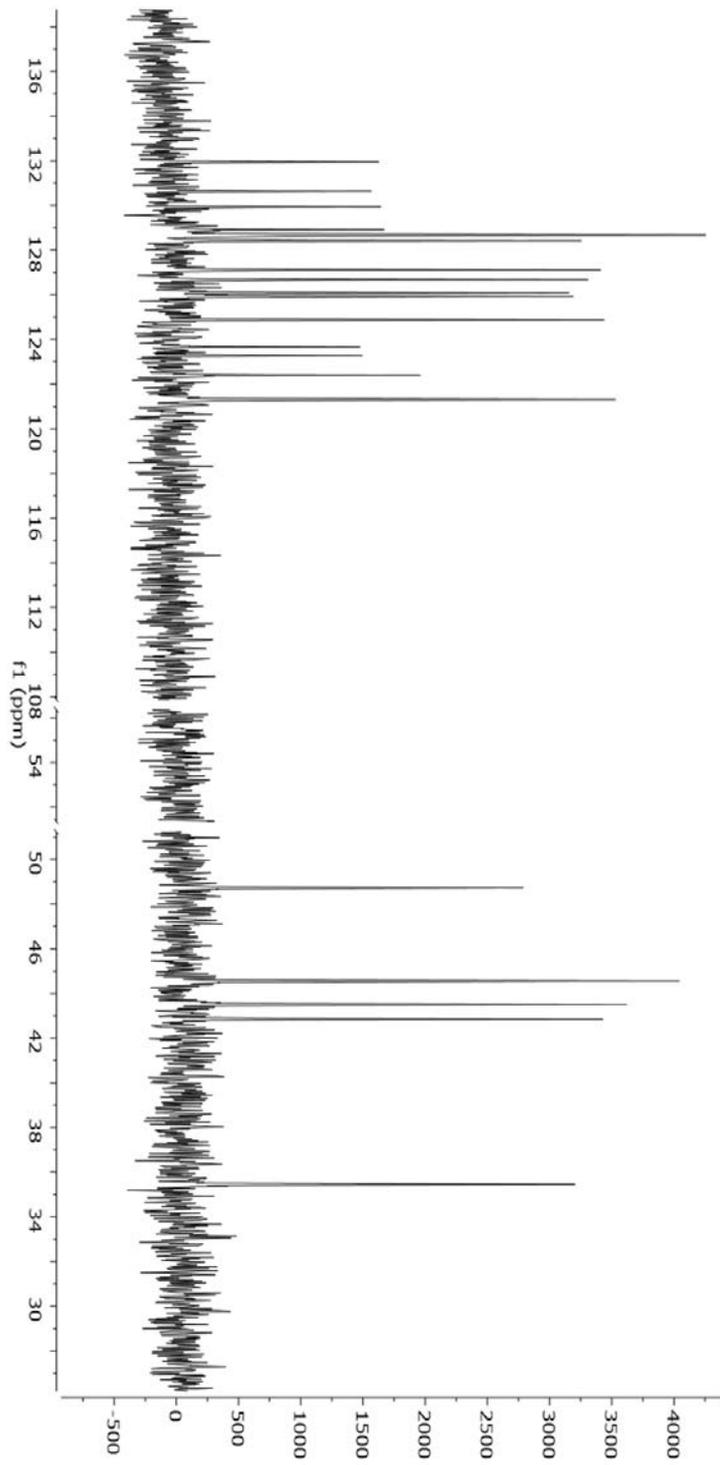


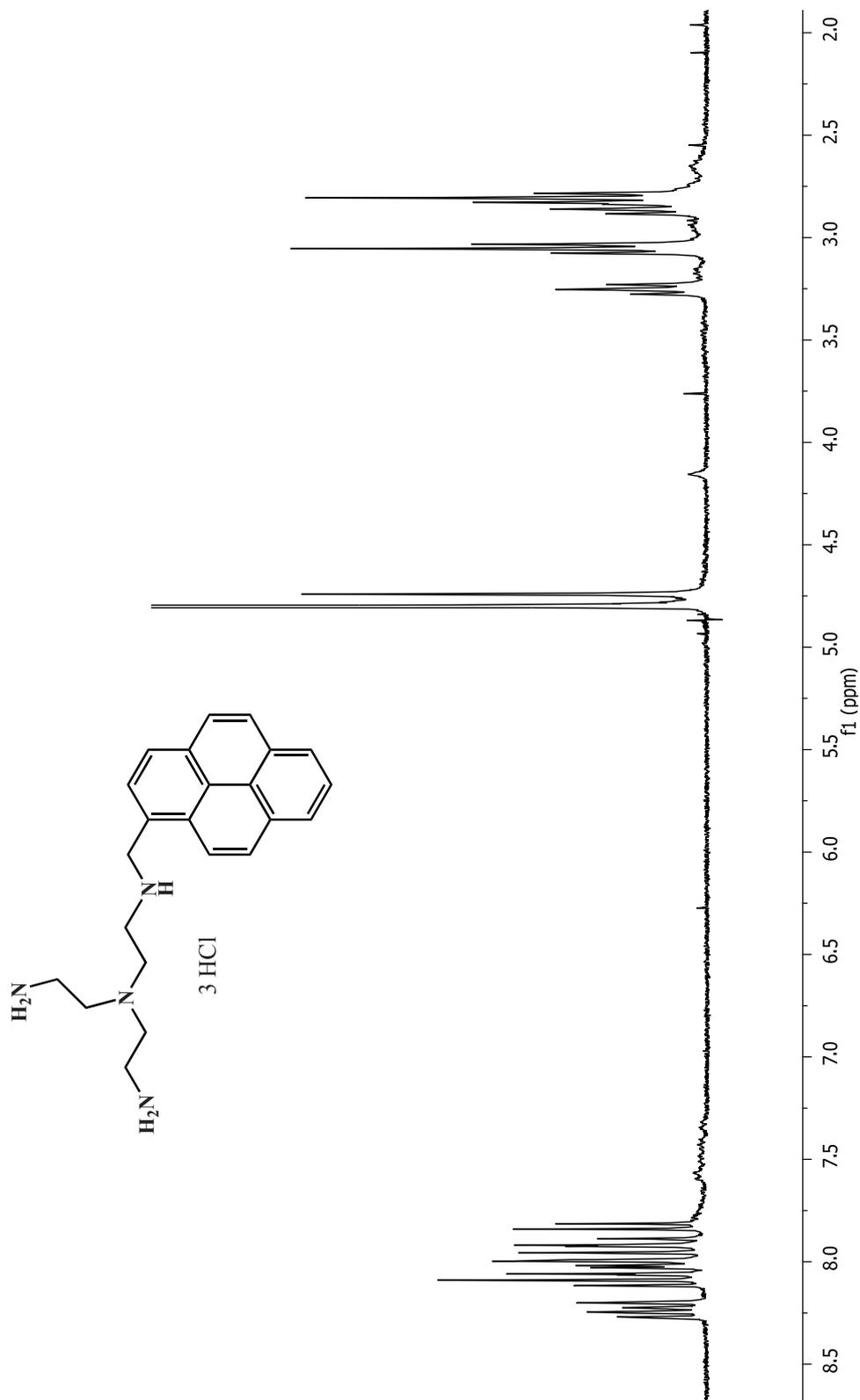
Apéndice A.

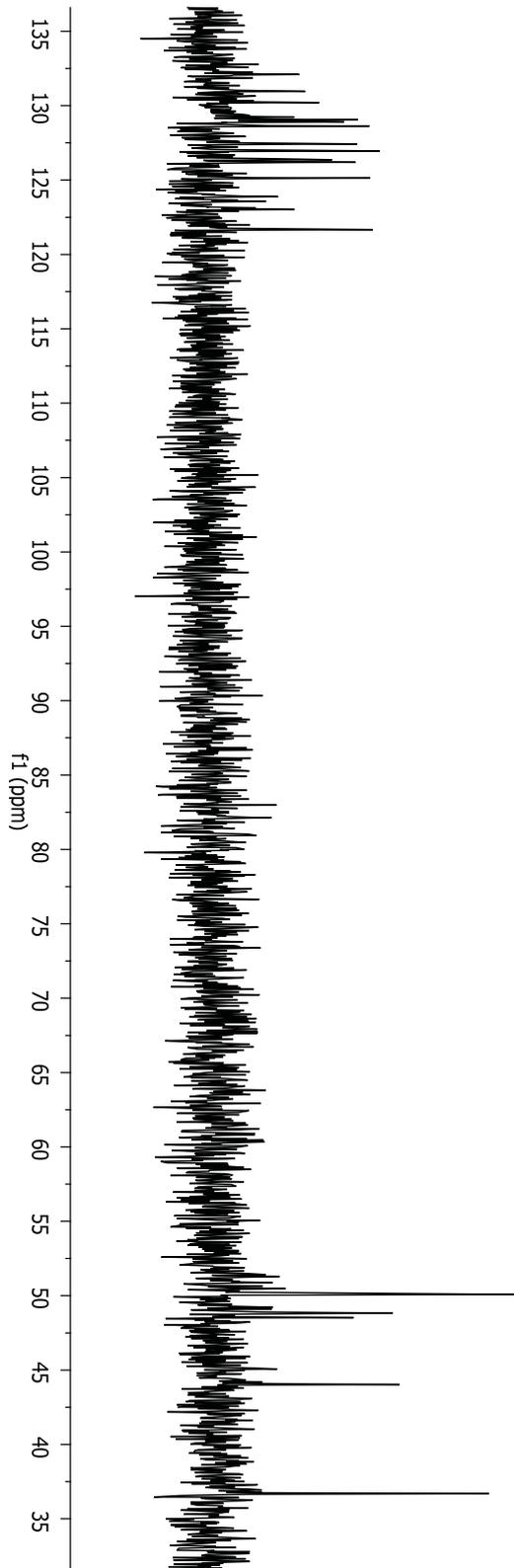














Apéndice B.

PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTA TESIS:

- E. Carbonell, E. Delgado-Pinar, J. Pitarch-Jarque, J. Alarcón, E. García-España, “*Boehmite Supported Pyrene Polyamine Systems as Probes for Iodide Recognition*”, Journal of Physical Chemistry, 2013, 117, 14325.
- E. Delgado-Pinar, C. Rotger, A. Costa, M. N. Piña, H. R. Jiménez, J. Alarcón, E. García-España. “*Grafted squaramide monoamine nanoparticles as simple systems for sulfate recognition in pure water*”, Chemical Communications, 2012, 48, 2609.
- E. Delgado-Pinar, M. T. Albelda, J. C. Frías, O. Barreiro, E. Tejera, Vojtěch Kubíčěk, L. J. Jiménez-Borreguero, F. Sánchez-Madrid, É. Tóth, J. Alarcón, E. García-España, “*Lanthanide Complexes as Imaging Agents Anchored on Nano-Sized Particles of Boehmite*”, Dalton Transactions, 2011, 40, 6451.
- E. Delgado-Pinar, N. Montoya, M. Galiana, M. T. Albelda, J. C. Frías, H. R. Jiménez, E. García-España, J. Alarcón, “*Preparation of Hg²⁺ selective fluorescent chemosensors based on surface modified core-shell aluminosilicate nanoparticles*”, New Journal of Chemistry, 2010, 34, 567.
- E. Delgado-Pinar, J. C. Frías, L. J. Jiménez-Borreguero, M. T. Albelda, J. Alarcón, E. García-España. “*One-pot preparation of surface modified boehmite nanoparticles with rare-earth cyclen Complexes*”, Chemical Communications, 2007, 3392.

PUBLICACIONES RELACIONADAS CON ESTA TESIS:

- L. Acosta-Rueda, E. Delgado-Pinar, J. Pitarch-Jarque, A. Rodríguez, S. Blasco, J. González, M. G. Basallote, E. García-España, “*Correlation between the molecular structure and the kinetics of decomposition of azamacrocyclic copper(II) complexes*”, Dalton Transactions, 2015, 44, 8255.
- C. Bazzicalupi, A. Bianchi, E. García-España, E. Delgado-Pinar, “*Metals in supramolecular chemistry*”, Inorganica Chimica Acta, 2014, 417, 3.

- A. Bianchi, E. Delgado-Pinar, E. García-España, C. Giorgi, F. Pina, “*Highlights of metal ion-based photochemical switches*”, *Coordination Chemistry Reviews*, 2014, 260, 156.
- A. Bianchi, E. Delgado-Pinar, E. García-España, F. Pina. “*Molecular Switching, Logics, and Memories*”. Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering, from *Comprehensive Inorganic Chemistry II (Second Edition)*, Oxford, Jan Reedijk and Kenneth Poeppelmeier, editors.8, pp. 969 - 1037. (Reino Unido): Elsevier, 2013.
- R. Ballesteros-Garrido, E. Delgado-Pinar, B. Abarca, R. Ballesteros, F. R. Leroux, F. Colobert, R. J. Zaragoza, E. García-España, “*Triazolopyridines. Part 28. The ringchain isomerization strategy: triazolopyridine- and triazoloquinolinepyridine based fluorescence ligands*”, *Tetrahedron*, 2012, 68, 3701.
- L. Rodríguez, E. Delgado-Pinar, A. Sornosa-Ten, J. Alarcón, E. García-España, M. Cano, J. C. Lima, F. Pina, “*Effect of water/carboxymethylcellulose gel on the excimer formation of polyamine ligands functionalized with naphthalene*”, *Journal of Physical Chemistry*, 2009, 113, 15455.
- J. Alarcón, M. T. Albelda, R. Belda, M. P. Clares, E. Delgado-Pinar, J. C. Frías, E. García-España, J. González, C. Soriano, “*Synthesis, coordination properties of an azamacrocyclic Zn(II) chemosensor complexes containing pendent methylnaphthyl groups*”, *Dalton Transactions*, 2008, 6530.
- R. Aucejo, P. Díaz, E. García-España J. Alarcón, E. Delgado-Pinar, F. Torres, C. Soriano, M. C. Guillen, “*Naphthalene-Containing Polyamines supported in Nanosized Boehmite Particles*”, *New Journal of Chemistry*, 2007, 31, 44.
- M. A. Kojdecki, E. Ruiz de Sola, F. J. Serrano, E. Delgado-Pinar, M. M. Reventós, V. J. Esteve, J. M. Amigó, J. Alarcón, “*Microstructural evolution of mullites formed from heated monophasic gels*”, *Journal of Applied Crystallography*, 2007, 40, 260.

- E. Ruiz de Sola, F. J. Serrano, E. Delgado-Pinar, M.M. Reventós, A. I. Pardo, M. A. Kojdecki, J. M. Amigó, J. Alarcón, “*Solubility and microstructural development of TiO₂-containing 3Al₂O₃.2SiO₂ and 2Al₂O₃.SiO₂ mullites obtained from single phase gels*”, Journal of the European Ceramic Society, 2007, 27 (7), 2647.

