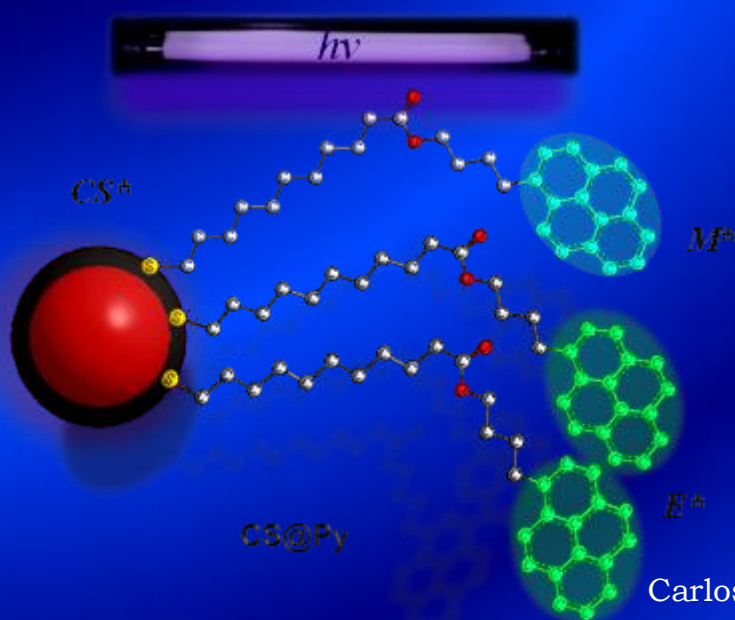


DISEÑO DE UN SISTEMA HÍBRIDO NANOPARTÍCULA SEMICONDUCTORA-PIRENO Y SU APLICACIÓN COMO SENSOR



Carlos E. Agudelo-Morales

TESIS DOCTORAL
Doctorado en Química Sostenible

INSTITUTO DE CIENCIA MOLECULAR -ICMoL
Noviembre
2016



UNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

AGÈNCIA
VALÈNCIANA

INSTITUTO DE CIENCIA MOLECULAR -
ICMol-

Doctorado en Química Sostenible

**Diseño de un sistema híbrido
nanopartícula semiconductor-pireno y
su aplicación como sensor**



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

CARLOS E. AGUDELO-MORALES

Valencia, España

Noviembre

2016

Dña. Julia Pérez Prieto, Profesora Catedrática de Química de la Universidad de Valencia, y Dña. Raquel E. Galian, Investigadora de la Fundación General de la Universidad de Valencia.

CERTIFICAN:

Que la presente Tesis Doctoral, titulada: “**Diseño de un sistema híbrido nanopartícula semiconductor semiconductor-pireno y su aplicación como sensor**” ha sido desarrollada por el Ingeniero- **Carlos Eduardo Agudelo Morales** en el Instituto de Ciencia Molecular (ICMol) de la Universidad de Valencia.

Prof: Julia Pérez Prieto

Dra.: Raquel E. Galian

¡ODA A LA VIDA !

*Por la maravillosa capacidad del ser humano de innovar,
a pesar de las adversidades y con el fin de encontrar un
futuro mucho más promisorio en nuestra estancia
planetaria.*

De la forma más sincera, deseo agradecer a los que contribuyeron de forma directa o indirectamente, en la elaboración de esta memoria del cual participaron varias personas leyendo, opinando, corrigiendo, teniéndome demasiada paciencia, dando ánimo, acompañando en los momentos difíciles y en los momentos de felicidad.

Agradezco especialmente a mis directoras la Dra. **Julia Pérez Prieto** y a la Dra. **Raquel E. Galian**; por haber confiado en mi persona, por la paciencia y por la dirección de investigación y que a pesar de las adversidades, la distancia y el tiempo me ayudaron demasiado en su finalización.

Un agradecimiento muy especial a la Consejería de Educación de la Comunidad Valenciana por la ayuda dada en el programa Santiago Grisolia.

A mi familia y seres queridos que estando en la distancia siempre han están a mi lado.

Admiración a los amigos y compañeros del laboratorio que estuvieron, están y estarán por las conexiones virtuales y que durante todo este tiempo ha existido una evolutiva enseñanza, y que ojala en un futuro no muy lejano podamos reencontrarnos.

En fin a todas las personas buenas y que han pasado por la vida hasta el día hoy y que siguen dándome ánimo para avanzar en esta lucha.

Gracias a todos.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	9
1.1. FUNDAMENTOS GENERALES DE FOTOQUÍMICA	11
1.2. PROCESOS RADIATIVOS: FLUORESCENCIA	15
1.2.1. FLUORESCENCIA EN ESTADO ESTACIONARIO	16
1.2.2. FLUORESCENCIA RESUELTA EN EL TIEMPO	18
1.2.3. RENDIMIENTO CUÁNTICO DE FLUORESCENCIA	21
1.2.4. DESACTIVACIÓN DE LA FLUORESCENCIA	22
1.3. FLUORESCENCIA MOLECULAR COMO HERRAMIENTA ANALÍTICA	26
1.3.1. SONDAS FLUORESCENTES	27
1.4. EL PIRENO COMO SONDA FLUORESCENTE	29
1.5. NANOPARTÍCULAS SEMICONDUCTORAS	33
1.5.1. PROPIEDADES FOTOFÍSICAS	34
1.5.2. ESTRUCTURA CORE-SHELL	37
1.5.3. EFECTO DEL LIGANDO EN LAS PROPIEDADES FOTOFÍSICAS	39
1.6. NITROCOMPUESTOS AROMÁTICOS	43
1.7. PERSPECTIVAS DEL TRABAJO	47
2. OBJETIVOS	53
3. RESUMEN DE ARTÍCULOS PUBLICADOS RELACIONADOS CON LA TESIS	59
3-1. PYRENE FUNCTIONALISED NANOPARTICLES: TWO INDEPENDENT SENSORS-THE EXCIMER AND THE MONOMER	61
3-2. NITROANILINES AS QUENCHERS OF PYRENE	87
3-3. THREE INDEPENDENT CHANNEL NANOHYBRIDS AS FLUORESCENT PROBES	109
4. TÉCNICAS EXPERIMENTALES UTILIZADAS EN EL DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN	135
5. JUSTIFICACIÓN DEL TEMA Y CONTRIBUCIÓN ORIGINAL DEL AUTOR	145

<u>6. RESUMEN DE LA TESIS</u>	<u>153</u>
<u>7. CONCLUSIONES</u>	<u>161</u>
<u>8. ARTÍCULOS PUBLICADOS RELACIONADOS CON LA TESIS</u>	<u>167</u>
<u>12. ARTÍCULOS PUBLICADOS NO RELACIONADOS CON LA TESIS</u>	<u>236</u>

1. INTRODUCCIÓN



1.1. Fundamentos generales de fotoquímica

El estudio de las reacciones químicas, isomerizaciones y comportamientos físicos que ocurren bajo la influencia de la luz visible o luz ultravioleta se denomina fotoquímica. Existen dos principios que son fundamentales para la comprensión de las transformaciones fotoquímicas¹.

- La primera ley de la fotoquímica, la ley de Grothus- Draper dice que la luz debe ser absorbida por un compuesto a fin de que una reacción fotoquímica pueda ocurrir.
- La segunda ley de la fotoquímica de Stark-Einstein dice que para cada fotón de luz absorbido por un sistema químico, sólo una molécula es activada.

En este sentido un estado excitado de una molécula se forma tras la absorción de un fotón, capaz de promover un electrón desde un orbital molecular ocupado de mayor energía (HOMO) a un orbital desocupado de menor energía (LUMO). Es así como se menciona que la promoción del HOMO al LUMO de un electrón es la transición de energía más favorecida que ocurre entre la frontera de orbitales moleculares. Cabe mencionar, que los electrones de los orbitales enlazantes estabilizan una molécula, mientras los electrones de los enlaces antienlazantes la desestabilizan (**figura 1**).

¹ Klán, P.; Wirz, J., *Photochemistry of organic compounds: From concepts to practice*. John Wiley & Sons: Noida, India, 2009.

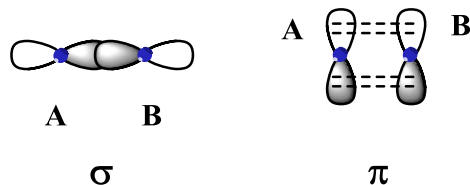


Figura 1: Ilustración de los dos orbitales orbitales σ (enlazantes) y π (no enlazantes).

Teniendo en cuenta el espín electrónico, una configuración electrónica con dos electrones con espines antiparalelos ($\uparrow\downarrow$) es conocida como estado singlete, mientras que en una configuración triplete (T_1) los electrones están organizados con espines paralelos ($\uparrow\uparrow$). Este concepto queda claramente expresado en el diagrama de Jablonski (**figura 2**), el cual muestra los estados electrónicos de una molécula que están implicados en múltiples procesos. Este diagrama es usado para visualizar los procesos fotofísicos que pueden tener lugar tras la absorción de luz por una molécula y/o la forma en que la molécula en estado excitado puede disipar su energía (procesos radiativos y no radiativos).

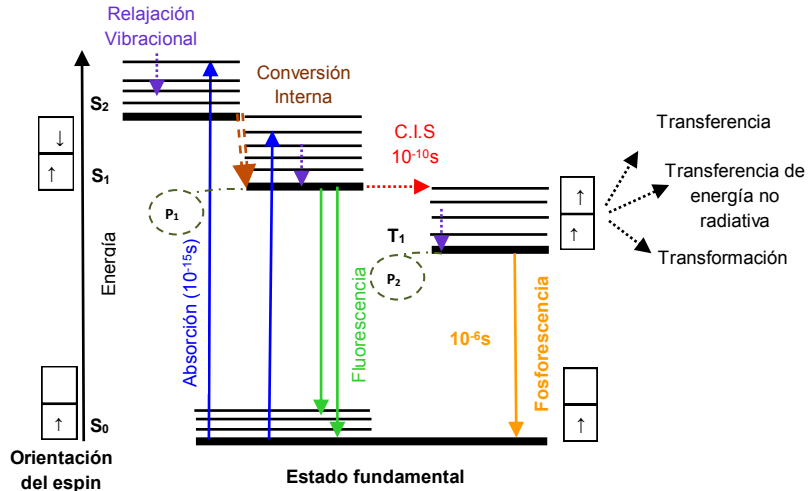


Figura 2: Diagrama de Jablonski modificado, las flechas representan la orientación del espín en el orbital molecular.

La descripción de los diferentes procesos se mencionan a continuación: “tras la absorción de un fotón de suficiente energía por una molécula orgánica en *estado fundamental*, se promueve un electrón enlazante o no enlazante a un nivel vibracional del singlete S₁ o S₂ o superiores, dependiendo de la energía del fotón. A continuación ocurre el proceso de conversión interna (CI) desde el estado S_n hasta el S₁ a través de relajación vibracional, proceso muy rápido (10⁻¹³-10⁻¹² s). De acuerdo a la *regla de Kasha*, todos los procesos ocurren desde el estado excitado S₁ de una molécula. La desactivación del estado S₁ ocurre, i) por conversión interna y/o por relajación vibracional al estado fundamental S₀, la energía vibracional es transformada en energía de excitación electrónica (por ejemplo calor), ii) por un proceso radiativo como la *emisión de*

fluorescencia y iii) por el cruce intersistema del singlete al triplete. Además, los tiempos de vida media del estado S_1 están alrededor de (10^{-12} - 10^{-6} s) permitiendo fotorreacciones inter-o-intramoleculares, las cuales requieren procesos de reorganización de las estructuras moleculares o ruptura de enlaces, para dar lugar al producto de reacción P_1 .

Una gran mayoría de las reacciones intermoleculares ocurren desde el estado excitado T_1 , generando diferentes estructuras moleculares (productos de reacción P_2). Esto es debido principalmente a que el tiempo de vida del estado triplete T_1 es mayor comparado con los otros procesos de desactivación. Los productos de reacción P_1 y P_2 son referenciados en la literatura generalmente como fotoproductos. Por regla general los tiempos de vida media del S_1 y T_1 dependen de la estructura de la molécula y las condiciones experimentales.²

Los estados singlete y triplete pueden estar implicados en procesos de transferencia de energía o de electrones a moléculas en estado fundamental. En las reacciones conocidas como de fotosensibilización, la radiación UV/VIS no es absorbida por el mismo sustrato que se transforma, si por la acción de un sensibilizador (*fotosensibilizador*). La molécula sensibilizadora excitada electrónicamente transfiere energía

² Braun, A. M.; Maurette, M.-T.; Oliveros, E., *Photochemical technology*. John Wiley & Son Ltd: New York, 1991.

electrónica al sustrato (molécula en el estado fundamental) o induce procesos de transferencia electrónica. Normalmente el sensibilizador es desactivado sin alteración química durante el proceso de fotosensibilización.³

1.2. Procesos radiativos: Fluorescencia

Cuando una molécula excitada retorna a su estado fundamental por procesos radiativos (como la emisión de fluorescencia) existen procesos en competencia: la conversión interna, cruce intersistema, transferencia de carga intramolecular y cambio conformacional. Las interacciones en los estados excitados con otras moléculas pueden también competir con la desactivación: transferencia electrónica, transferencia de protones, transferencia de energía, formación de excíplejos o excímeros.^{4,5}

Estas rutas de desactivación pueden competir con la emisión de fluorescencia si ocurren a una escala de tiempo comparable con el tiempo de vida medio de la molécula en

³ Oppenländer, T., *Photochemical Purification of Water and Air: Advanced Oxidation Processes (AOPs)-Principles, Reaction Mechanisms, Reactor Concepts*. John Wiley & Sons: Germany, 2003.

⁴ Un excímero resulta de la interacción de dos moléculas del cromóforo una en el estado excitado y otra en el estado fundamental. El excíplejo resulta de la interacción entre una molécula del cromóforo en el estado excitado y otra diferente en el estado fundamental.

⁵ Birks, J. B., Excimers. *Reports on Progress in Physics* **1975**, 38 (8), 903-974.

estado excitado singlete y afecta las características de la fluorescencia (espectro, rendimiento cuántico, tiempo de vida).

1.2.1. Fluorescencia en estado estacionario

La emisión de fotones que acompaña la transición $S_1 \rightarrow S_0$ se conoce como *fluorescencia*, la emisión de fluorescencia ocurre desde el S_1 y por lo tanto sus características no dependen (excepto la polarización) de la longitud de onda de excitación.

En las mediciones de la fluorescencia la fuente de luz es una lámpara que emite un flujo constante de fotones por unidad de tiempo, con una energía determinada. Bajo iluminación continua, la concentración de una molécula en estado excitado $[M^*]$ permanece siempre constante, con lo que significa que M^* se encuentra en estado estacionario **figura 3**. Las mediciones bajo estas condiciones son las conocidas como mediciones en estado estacionario.

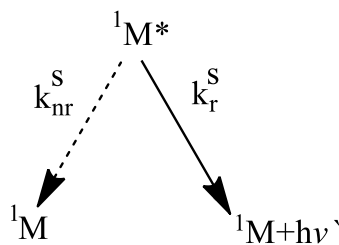


Figura 3. Esquema de las constantes de medición en estado estacionario de la fluorescencia.

Por esta razón la variación de $[M^*]$ en el tiempo, es igual a cero (0), **ecuación 1.**

$$\frac{d[M^*]}{dt} = 0 = k_a N_0 - (k_r^S + k_{nr}^S)[M^*] \quad \text{Ecuación 1.}$$

De esta ecuación, N_0 representa la cantidad constante de fotones durante un tiempo dado y unidad de volumen que son incidentes en la muestra $[M]$, k_a corresponde a la constante del proceso de absorción ($k_a \approx 10^{15} \text{ s}^{-1}$), k_r^S es la constante cinética de desactivación radiativa $S_1 \rightarrow S_0$ con emisión de fluorescencia, k_{nr}^S es la constante cinética de desactivación no radiativa $S_1 \rightarrow S_0$ (k_r^S y $k_{nr}^S \approx 10^7 - 10^{10} \text{ s}^{-1}$).

Entonces, $k_a N_0$ representa la cantidad de fotones absorbidos por unidad de volumen y tiempo, pudiéndose reescribir como I_0 , que representa la intensidad de la luz (en moles de fotones por litro-segundo), la constante de concentración $[M^*]$ se expresa según la **ecuación 2.**

$$[M^*] = \frac{I_0}{k_r^S + k_{nr}^S} \quad \text{Ecuación 2.}$$

La cantidad de fotones emitidos por unidad de tiempo y volumen esta dado por la **ecuación 3** y está relacionada con la intensidad de fluorescencia en el estado estacionario.

$$I_F = k_r^S [M^*] = I_0 \frac{k_r^S}{k_r^S + k_{nr}^S} \quad \text{Ecuación 3.}$$

1.2.2. Fluorescencia resuelta en el tiempo

El tiempo de vida media de una molécula en el estado excitado se refiere a la duración en una escala de tiempo medible de los diferentes fluoróforos y sus distintas interacciones. Las constantes de velocidad implicadas en los procesos de desactivación de los estados excitados se describen en la **figura 4**.

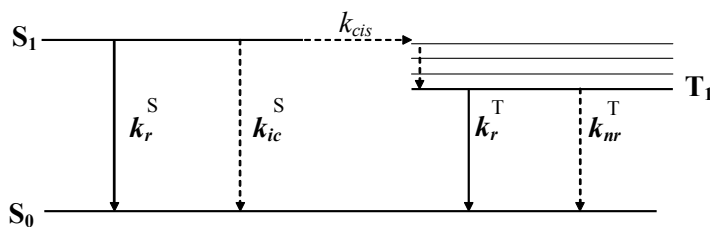


Figura 4. Representación gráfica de los diferentes tiempos de vida.⁶

Adaptado con autorización. Copyright (2012)

Donde, k_{ic}^S es la constante cinética de conversión interna $S_1 \rightarrow S_0$ y k_{cis} , es la constante cinética de cruce intersistema.

Teniendo en cuenta los dos caminos no radiativos de desactivación desde el S₁, es conveniente introducir la constante cinética total k_{nr}^S que denota simplemente como:

$$k_{nr}^S = k_{ic}^S + k_{isc} \quad \text{Ecuación 4.}$$

⁶ Valeur, B.; Berberan-Santos, M. N., *Molecular fluorescence: principles and applications*. John Wiley & Sons: 2012.

En el estado triplete la desactivación de T_1 , posee las constantes análogas al estado singlete S_1 .

Las contantes de los procesos mencionados anteriormente pueden ser estimadas de la siguiente manera; “en primer lugar se considera una solución diluida de una especie fluorescente, cuya concentración es $[M]$ (mol L^{-1}), y un pulso de luz corto⁷ (cuya duración es corta en relación a la constante a analizar) a tiempo 0, cierto número de moléculas M son llevadas al estado excitado S_1 por la absorción de fotones. Estas moléculas excitadas retornan a S_0 , por los diferentes procesos y finalmente son analizados con una cinética clásica. La cinética de desactivación de moléculas excitadas esta expresada por la **ecuación 5**:

$$-\frac{d[M^*]}{dt} = (k_r^s + k_{nr}^s)[M^*] \quad \text{Ecuación 5.}$$

Integrando esta ecuación respecto a la concentración tenemos:

$$[M] = [M^*]_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau_S}\right) \quad \text{Ecuación 6.}$$

Donde τ_S , es el tiempo de vida media del estado excitado S_1 , y está dado por:

⁷ Estrictamente dicho el pulso de la luz es una función δ (Dirac).⁶

$$\tau_S = \frac{1}{k_r^S + k_{nr}^S} \quad \text{Ecuación 7.}$$

Como se mencionó anteriormente bajo iluminación continua, la concentración de $[M^*]$ permanece constante, lo cual hace que M^* se encuentre en estado estacionario. De esta manera la intensidad de fluorescencia I_F es proporcional a un tiempo t dado después de la excitación por un pulso de luz a tiempo 0, a la concentración de moléculas excitadas $[M^*]$; el factor de proporcionalidad es la constante cinética radiativa de excitación k_r^S .

$$I_F(t) = k_r^S [M^*] = k_r^S [M^*]_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau_S}\right) \quad \text{Ecuación 8.}$$

Generalmente $I_F(t)$ decrece de una forma monoexponencial (**figura 5**). El tiempo de vida media de una muestra homogénea de un sólo fluoróforo puede ser considerado como independiente de la longitud de onda de excitación.

El tiempo de desactivación de fluorescencia τ_S es una de las más importantes características de una molécula fluorescente debido a que esta escala de tiempo permite la observación de fenómenos dinámicos. Estos estudios reciben normalmente el nombre de resueltos en el tiempo.

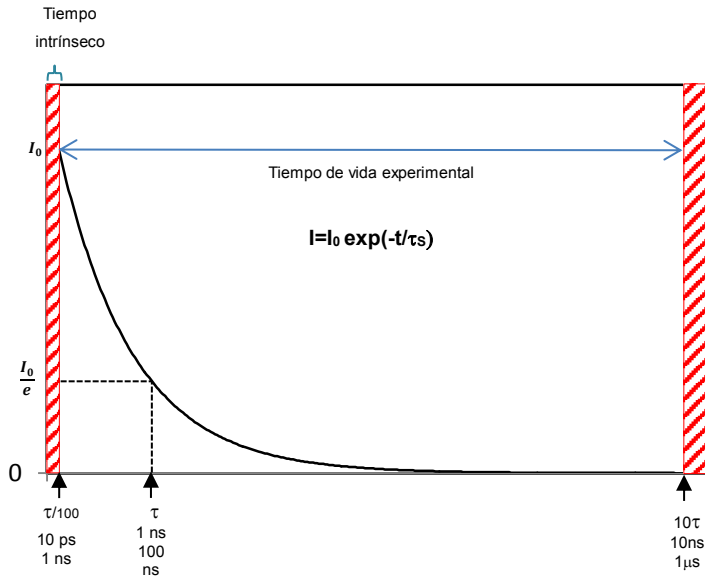


Figura 5. Desactivación de la intensidad de fluorescencia con el tiempo. El tiempo de vida τ es el tiempo necesario para que la concentración de la “entidad molecular” decaiga a $1/e$. ($e=2,7182$)⁶
Adaptado con autorización. Copyright (2012)

1.2.3. Rendimiento cuántico de Fluorescencia

El rendimiento cuántico de fluorescencia Φ_F es la fracción de moléculas excitadas que retornan al estado fundamental S_0 con emisión de fluorescencia y se expresa según la **ecuación 9**.

$$\Phi_F = \frac{k_r^S}{k_f^S + k_{nr}^S} = k_r^S \tau_S \quad \text{Ecuación 9.}$$

Cuando se presenta una perturbación externa, el rendimiento cuántico de fluorescencia puede disminuir proporcionalmente con el tiempo de vida media del estado excitado (por ejemplo en el caso de una desactivación dinámica). Sin embargo, la proporcionalidad no puede ser válida si el camino de desactivación es distinto debido a interacciones con otras moléculas. Por ejemplo, la formación de un complejo en el estado fundamental que no es fluorescente (desactivación estática)⁸.

1.2.4. Desactivación de la Fluorescencia

El fenómeno de *desactivación de fluorescencia* se refiere a los procesos que provocan una disminución de la intensidad de fluorescencia. La desactivación puede ser resultado de uno o varios mecanismos y es una evidencia de interacciones de una molécula en estado excitado M^* con una entidad u otra molécula ajena denominada “desactivador o quencher” Q, donde k_q representa la constante de procesos bimoleculares, ver **figura 6**.

Algunos de los principales procesos fotofísicos intermoleculares responsables de la disminución de fluorescencia que serán estudiados en esta tesis se presentan en la **tabla 1**.

⁸ Lakowicz, J. R., *Principles of fluorescence spectroscopy*. Springer Science & Business Media: Baltimore, Maryland, 2013.

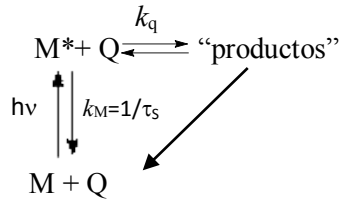


Figura 6. Mecanismo de desactivación⁶. **Adaptado con autorización.**

Copyright (2012).

Tabla 1. Algunos de los procesos fotofísicos responsables de la desactivación de fluorescencia.

Procesos fotofísicos	$\text{M}^* + \text{Q} \rightarrow \text{productos}$	Donante	Aceptor
Transferencia de electrones	${}^1\text{D}^* + \text{A} \rightarrow \text{D}^{\cdot+} + \text{A}^{\cdot-}$	${}^1\text{D}^*$	A
	${}^1\text{A}^* + \text{D} \rightarrow \text{A}^{\cdot-} + \text{D}^{\cdot+}$	D	${}^1\text{A}^*$
Formación de Excímero	${}^1\text{M}^* + \text{M} \rightarrow {}^1(\text{MM})^*$		
Formación de excíplejo	${}^1\text{D}^* + \text{A} \rightarrow {}^1(\text{DA})^*$	${}^1\text{D}^*$	A
	${}^1\text{A}^* + \text{D} \rightarrow {}^1(\text{DA})^*$	D	${}^1\text{A}^*$
Transferencia de energía	${}^1\text{D}^* + {}^1\text{A} \rightarrow {}^1\text{D} + {}^1\text{A}^*$	${}^1\text{D}^*$	${}^1\text{A}$
	${}^3\text{D}^* + {}^1\text{A} \rightarrow {}^1\text{D} + {}^3\text{A}^*$	${}^3\text{D}^*$	${}^1\text{A}$
	${}^3\text{D}^* + {}^3\text{A} \rightarrow {}^1\text{D} + {}^3\text{A}^*$	${}^3\text{D}^*$	${}^3\text{A}$
	${}^1\text{M}^* + {}^1\text{M} \rightarrow \text{M} + {}^1\text{M}^*$	${}^1\text{M}^*$	${}^1\text{M}$

Este fenómeno puede dividirse en dos grandes grupos: “desactivación colisional o dinámica”, cuando la desactivación es resultado del choque entre las moléculas (fluorescente y desactivador “quencher”, y “desactivación estática”, cuando es el resultado de la formación de un complejo entre el fluoróforo

y el desactivador, ambos en el estado fundamental. Con el fin de distinguir la naturaleza de la desactivación es necesario un estudio adecuado de los tiempos de vida de fluorescencia del sistema⁸.

Ambos tipos de desactivación requieren en muchos casos el contacto directo entre la molécula fluorescente y el desactivador. En disolución, el *proceso difusional* limita la velocidad con la que ambas moléculas (especie excitada y el desactivador) se encuentran, pero prolonga el encuentro ya que permite que ocurran cientos de choques antes de separarse.⁶ Este tipo de interacción puede dar una valiosa información sobre la cercanía o accesibilidad del fluoróforo a diferentes desactivadores, y es una herramienta metodológica fundamental en este tipo de estudios.

La desactivación de la fluorescencia se analiza mediante la relación de *Stern-Volmer*, donde I_0 e I representan la intensidad de fluorescencia en ausencia y presencia del desactivador respectivamente, $[Q]$ es la concentración de desactivador, k_q ($M^{-1}s^{-1}$) corresponde a la constante cinética de colisión y K_{sv} (M^{-1}) se denomina constante de *Stern-Volmer* ($K_{sv} = k_q \tau_S$)⁸, **ecuación 11**.

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_{sv}[Q] = 1 + k_q \tau_S [Q] \quad \text{Ecuación 11.}$$

La desactivación dinámica de una especie también se manifiesta en la reducción de su tiempo de vida. Por ello, se cumple la relación $\frac{I_0}{I} = \frac{\tau_0}{\tau}$, siendo τ_0 y τ el tiempo de vida de la especie en ausencia y en presencia del desactivador respectivamente.

Una gran variedad de moléculas pueden actuar como desactivadores de fluorescencia. Uno de los mejores ejemplos de desactivación colisional es el observado por el oxígeno molecular. Otros desactivadores son las aminas alifáticas y aromáticas, xenón, peróxido de hidrógeno, acrilamida, bromato, yoduro, etc. Debido a la gran variedad de moléculas desactivadoras, es importante identificar muy claramente aquéllas de interés para cada molécula fluorescente en particular.

Un ajuste lineal de la ecuación de *Stern- Volmer* normalmente nos indica un fluoróforo que es accesible al desactivador. Si existen dos poblaciones de fluoróforo y uno de ellos no es accesible al desactivador, la ecuación se desvía de la linealidad hacia la abscisa (eje x).

En otra situación, el quenching estático o desactivación estática se produce por la formación de un complejo en el estado fundamental y este proceso es gobernado por un equilibrio químico. La concentración total del fluoróforo [I] viene dada por la **ecuación 12**. La sustitución de esta expresión

en la constante de equilibrio permite deducir la ecuación de *Stern-Volmer* para la desactivación estática de fluorescencia ⁶, **ecuaciones 13 y 14.**



Ecuación 12.

$$K_{SV} = \frac{[I_0] - [I]}{[I][Q]} = \frac{[I_0]}{[I][Q]} - \frac{1}{[Q]} \quad \text{Ecuación 13.}$$

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_{SV}[Q] \quad \text{Ecuación 14.}$$

1.3. Fluorescencia molecular como herramienta analítica

En concreto, las diferentes técnicas analíticas basadas en fluorescencia son muy útiles por su alta sensibilidad y selectividad, y aporta ventajas de resolución espacial y temporal.

Cuando un analito es fluorescente, la detección fluorimétrica es posible por medio de un espectrofluorímetro, manipulado a una longitud de onda apropiada de excitación y longitud de onda de observación. Este es el caso de los hidrocarburos aromáticos. Existen numerosos ejemplos de aplicación que han sido reportados en la literatura tales como: análisis de contaminantes en aire y agua, aceites, alimentos,

fármacos; monitoreo de procesos industriales; monitoreo de especies de relevancia clínica; criminología; etc.⁹ Sin embargo, muchos iones y moléculas encontrados en la naturaleza no son fluorescentes y los métodos usados para un análisis analítico son del tipo indirecto, siendo algunas estrategias:⁶

- **Derivatización:** reacciones de analitos con el propósito de modificar un compuesto o generar uno que permita su detección por medio de la fluorescencia, siendo a menudo usado en conjunto con cromatografía líquida con detección de fluorescencia. Estos métodos son usados normalmente en bioquímica y química industrial.
- **Formación de un complejo fluorescente:** es el método más sencillo y práctico para el reconocimiento de iones y reconocimiento molecular.
- **Desactivación de fluorescencia:** Es el resultado de las colisiones del analito con un compuesto fluorescente. Este método es apropiado para la detección de gases como el oxígeno (disuelto en agua o sangre), SO₂, H₂S, amonio, HCl, Cl₂, etc.

1.3.1. Sondas Fluorescentes

Normalmente las moléculas fluorescentes son usadas como sondas para la investigación de diferentes tipos de

⁹ Nahata, A., Spectrofluorimetry as an analytical tool. *Pharmaceutica Analytica Acta* 2012, 2011, 2-7.

sistemas biológicos o fisicoquímicos ⁶, debido a la fuerte influencia del medio circundante en la emisión de fluorescencia de estas moléculas. Una clase de prueba fluorescente extrínseca es la que se realiza sin unión covalente entre los componentes. Estas pruebas son gobernadas por la naturaleza química del fluoróforo y el resultado de las interacciones que pueda establecer con el sistema probado.

A menudo con el uso de sondas extrínsecas fluorescentes se hace posible la perturbación local inducida por la sonda misma en el ambiente a analizar. En este sentido, las consideraciones a tener en cuenta para la correcta elección de una sonda se resumen en la **figura 7**.

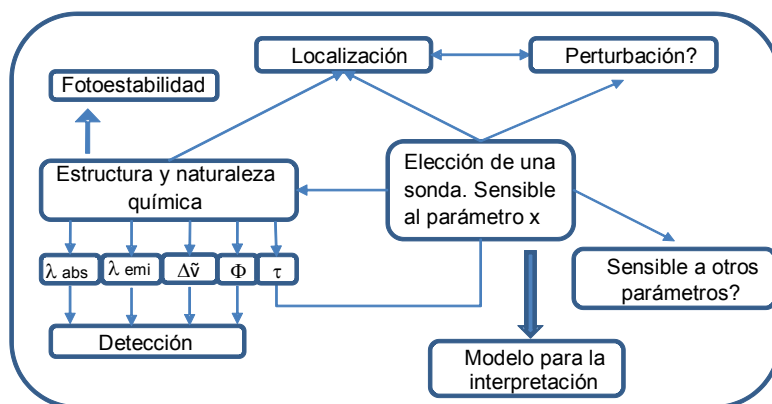


Figura 7. Algunas estrategias para la elección de una sonda $\Delta\nu$, Φ y τ corresponden al desplazamiento de Stokes, rendimiento cuántico de fluorescencia y tiempo de vida media respectivamente ⁶. **Adaptado**

con autorización. Copyright (2012).

1.4. El pireno como sonda fluorescente

El pireno, es un fluoróforo hidrofóbico planar, posee 16 π electrones conjugados, y no está sujeto a la regla de Huckel $(4n+2)^{10}$, emite en la zona 340-420 nm, presenta bandas de emisión de fluorescencia bien resultas (I_1 , I_2 , I_3) y un rendimiento cuántico de fluorescencia elevado ($\Phi_F = 0,72$ en etanol y $0,52$ en cloroformo)¹¹. Su espectro de absorción y de fluorescencia (**figura 8**) son simétricos (cumplen la regla de espejo), cuenta con una transición $S_0 \rightarrow S_1$ parcialmente prohibida ($\epsilon_{\max} \sim 500$)¹². La energía entre los niveles de transición de fluorescencia es fácilmente perturbada por la polaridad del disolvente. Esta sensibilidad hace que el pireno sea una excelente sonda de polaridad para medios

¹⁰ Baba, M.; Saitoh, M.; Kowaka, Y.; Taguma, K.; Yoshida, K.; Semba, Y.; Kasahara, S.; Yamanaka, T.; Ohshima, Y.; Hsu, Y.-C., Vibrational and rotational structure and excited-state dynamics of pyrene. *The Journal of chemical physics* **2009**, *131*, 224318-224328.

¹¹ (a) Schwarz, F. P.; Wasik, S. P., Fluorescence measurements of benzene, naphthalene, anthracene, pyrene, fluoranthene, and benzo [e] pyrene in water. *Analytical chemistry* **1976**, *48*, 524-528; (b) Nishizawa, S.; Kato, Y.; Teramae, N., Fluorescence sensing of anions via intramolecular excimer formation in a pyrophosphate-induced self-assembly of a pyrene-functionalized guanidinium receptor. *Journal of the American Chemical Society* **1999**, *121*, 9463-9464.

¹² Turro, N. J.; Ramamurthy, V.; Scaiano, J. C., *Principles of molecular photochemistry: an introduction*. University science books: Sausalito, California, 2009.

supramoleculares ¹³ . Además el pireno presenta buena absorción, fotoestabilidad, elevado tiempo de vida del singlete (>100ns).

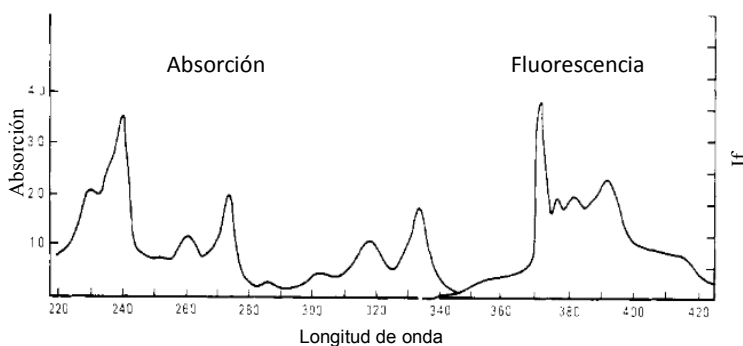


Figura 8. Espectro de absorción y de fluorescencia de 165µg/l de pireno en H₂O.¹¹ Adaptado con autorización. Copyright (1976) American Chemical Society.

Entre sus diferentes aplicaciones, reporta información sobre la estructura y dinámica de sistemas macromoleculares, propiedades superficiales y el lugar de adsorción¹⁴. Por otra parte ha sido usado como herramienta analítica fluorescente

¹³ Bohne, C.; Abuin, E. B.; Scaiano, J. C., Characterization of the triplet-triplet annihilation process of pyrene and several derivatives under laser excitation. *Journal of the American Chemical Society* **1990**, *112* (11), 4226-4231.

¹⁴ Chen, W.; Durning, C. J.; Turro, N. J., Photodegradation of Pyrene-Labeled Polystyrene Adsorbed on Silica Surface in Chloroform. *Macromolecules* **1999**, *32* (12), 4151-4153.

selectiva de especies químicas (iones, oxígeno, explosivos, entre otros).¹⁵

Asimismo, su fluorescencia presenta una alta dependencia con la concentración, observándose la formación del excímero (E*), con una banda característica alrededor de los 470 nm cuando se tienen concentraciones de pireno en el orden milimolar, **figura 9**.

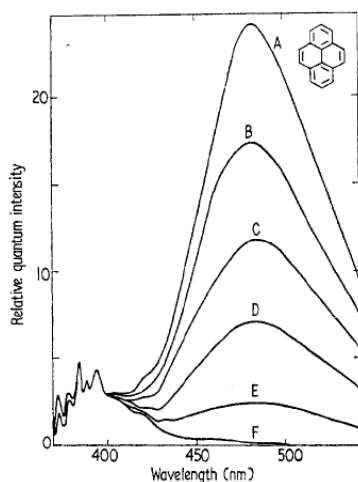


Figura 9. Espectro de fluorescencia de pireno en ciclohexano.

Intensidades normalizadas. Concentraciones A= 10^{-2} M; B= 7.75×10^{-3} M; C= 5.50×10^{-3} M; D= 3.25×10^{-3} M; E= 10^{-3} M; F= 10^{-4} M.⁵ **Copyright**

© 2016 Reports on Progress in Physics.

¹⁵ (a) Meaney, M. S.; McGuffin, V. L., Investigation of common fluorophores for the detection of nitrated explosives by fluorescence quenching. *Analytica Chimica Acta* **2008**, *610*, 57-67.; (b) Bains, G.; Patel, A.B.; Narayanaswami, V.; Pyrene: A Probe to Study Protein Conformation and Conformational Changes, *Molecules* **2011**, *16*, 7909–7935.

Normalmente, cuando una solución con altas concentraciones de pireno es irradiada con luz ultravioleta en presencia o ausencia de un desactivador, se observa emisión de fluorescencia del monómero y/o del excímero.

Se han reportados diferentes usos del pireno como sonda fluorescente extrínseca, por ejemplo en la identificación de regiones hidrofílicas o detección de aminoácidos (HPTS)¹⁶, como quimiosensor en reconocimiento selectivo de especies químicas con aplicaciones analíticas potenciales¹⁷, en la detección de explosivos nitrados mediante la desactivación de su fluorescencia en estado estacionario, entre otros usos.¹⁸

¹⁶ Bhosale, R. S.; Shitre, G. V.; Kumar, R.; Biradar, D. O.; Bhosale, S. V.; Narayan, R.; Bhosale, S. V., A 8-hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonic acid trisodium salt (HPTS) based colorimetric and green turn-on fluorescent sensor for the detection of arginine and lysine in aqueous solution. *Sensors and Actuators B: Chemical* <<http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2016.10.002>>.

¹⁷ (a) Lee, S. H.; Kim, S. H.; Kim, S. K.; Jung, J. H.; Kim, J. S., Fluorescence Ratiometry of Monomer/Excimer Emissions in a Space-Through PET System. *The Journal of Organic Chemistry* **2005**, *70* (23), 9288-9295; (b) Schazmann, B.; Alhashimy, N.; Diamond, D., Chloride Selective Calix[4]arene Optical Sensor Combining Urea Functionality with Pyrene Excimer Transduction. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128* (26), 8607-8614.

¹⁸ Chen, W.; Zuckerman, N. B.; Konopelski, J. P.; Chen, S., Pyrene-Functionalized Ruthenium Nanoparticles as Effective Chemosensors for Nitroaromatic Derivatives. *Analytical Chemistry* **2010**, *82* (2), 461-465.

1.5. Nanopartículas semiconductoras

Los quantum dots (QDs) o “puntos cuánticos” son semiconductores a escala nanométrica (generalmente de unos pocos nanómetros). Estas nanopartículas están formadas por elementos de los grupos 12-16, (por ejemplo **CdSe**, CdS, CdTe, ZnSe), 13-15 (InAs, InP) o 14-16 (Pb-Se) de la tabla periódica, **figura 10**¹⁹. Los QDs del tipo core” (CdS CdSe, CdTe, etc) han sido utilizados para el análisis de biorreconocimiento de eventos o transformaciones biocatalíticas, debido a sus grandes cualidades fluorescentes comparadas con otros fluoróforos orgánicos. Estas nanopartículas han sido utilizadas fundamentalmente como marcadores fluorescentes en sistemas biológicos. Sin embargo, existe un número creciente de ejemplos en la literatura de su utilización como sensores de moléculas o iones ²⁰. Entre sus principales cualidades se incluyen amplios espectros de absorción UV/VIS y un elevado rendimiento cuántico de fluorescencia, espectros de emisión estrechos y reducción al fotoblanqueo.

¹⁹ Jamieson, T.; Bakhshi, R.; Petrova, D.; Pocock, R.; Imani, M.; Seifalian, A. M., Biological applications of quantum dots. *Biomaterials* **2007**, *28*, 4717-4732.

²⁰ Frasco, M. F.; Chaniotakis, N., Semiconductor quantum dots in chemical sensors and biosensors. *Sensors* **2009**, *9* (9), 7266-7286.

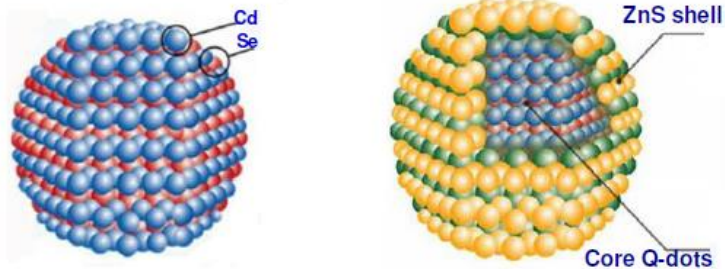


Figura 10. Representación de QD de CdSe tipo core.y core-shell.

<http://nanophotonica.net/>

1.5.1. Propiedades fotofísicas

En el régimen de los nanómetros, los semiconductores presentan efectos de confinamiento cuántico. En un semiconductor, los niveles electrónicos de los átomos que conforman el cristal se combinan para formar bandas de energía (*bandas de valencia "bv"*) totalmente ocupadas por los electrones y bandas no ocupadas o parcialmente ocupadas por electrones (*bandas de conducción "bc"*). Las bandas de conducción y las bandas de valencia discontinuas en el material neto "bulk" se transforman en niveles discretos. Así, un clúster (agrupación de pocos átomos) de cristal semiconductor, las transiciones electrónicas entre la banda de valencia y la banda de conducción presentan analogía a las transiciones HOMO-LUMO en moléculas. La radiación UV/VIS con energía igual o superior a la separación entre las bandas (energía del band-gap, E_{bg}). Produce la excitación de un electrón (e^-) desde la banda de valencia a un nivel superior (banda de conducción), creando un

huevo (h^+) en la banda de valencia. La formación del “par electrón-huevo” es conocida comúnmente como excitón y la recombinación de este par electrón-huevo da lugar al fenómeno de la fluorescencia, **figura 11**²¹.

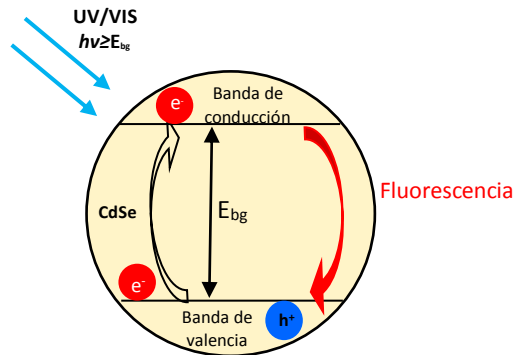


Figura 11: Representación esquemática de algunos procesos fotofísicos en un semiconductor del tipo CdSe, (energía del bandgap) E_{gb} .

La posición del pico del excitón depende del valor de E_{bg} que depende del tamaño del QD ²¹. La forma y el ancho de la banda de absorción depende de la distribución de tamaños y la estequiometría de átomos de Cd/Se en la nanopartícula. Sus amplios espectros de absorción hacen posible la excitación de estos materiales a diferentes longitudes de onda dentro del rango UVA/VIS, **figura 12**.

Los QD presentan altos rendimientos cuánticos de fluorescencia, que dependen de la calidad del QD. Este

²¹ (a) Banin, U.; Millo, O., Properties. In *Nanoparticles*, Schmid, G., Ed. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: 2005; (b) Schmid, G., *Nanoparticles: from theory to application*. John Wiley & Sons: Weinheim, 2011.

rendimiento cuántico de la fluorescencia puede reducirse por diferentes factores, tales como las condiciones en la síntesis, iluminación, la naturaleza de los ligandos, condiciones de almacenamiento, entre otros. Estos factores pueden inducir a la aparición de defectos en la superficie de los QD (trap states)²², generando fenómenos de desactivación no radiativa. Estos defectos, son imperfecciones en la simetría geométrica de los átomos en la estructura cristalina de la nanopartícula. Estas imperfecciones se pueden reducir o minimizar considerablemente por medio de una correcta pasivación de la superficie del QD.

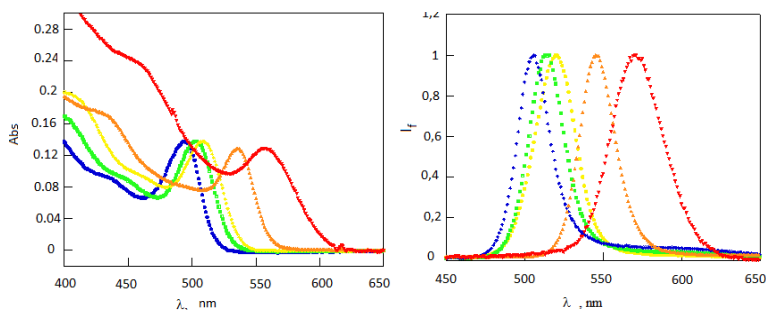


Figura 12. Espectros a) de absorción y b) de emisión de los QDs de CdSe distinto tamaño.²³ **Adaptado con autorización. Copyright (2009)**

²² Carrillo-Carrion, C.; Cardenas, S.; Simonet, B. M.; Valcarcel, M., Quantum dots luminescence enhancement due to illumination with UV/Vis light. *Chemical Communications* **2009**, (35), 5214-5226.

²³ Galian, R. E.; de la Guardia, M., The use of quantum dots in organic chemistry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2009**, 28 (3), 279-291.

La pasivación puede realizarse mediante el uso de una segunda capa de material semiconductor dando como resultado un sistema core-shell (nucleo-corteza). El shell se utiliza para incrementar el rendimiento cuántico de fluorescencia, mejorar la estabilidad a los procesos de fotoblanqueo y dar estabilidad frente a la fotodegradación²⁴

1.5.2. Estructura Core-Shell

Según las posiciones relativas de los niveles energéticos y la banda prohibida, los QD pueden dividirse en dos tipos de sistemas, denominadas tipo 1 y tipo 2.

En el primer sistema (**tipo 1**) los core-shell (CS), por ejemplo CdSe/ZnS, la banda prohibida del shell (ZnS) es mayor a la banda prohibida del core (CdSe), además la bv del shell se encuentra situada a un nivel más bajo que la bv del core, y de forma inversa la bc del shell está por encima de bc del core **figura 13**. Este tipo de shell juega un papel crucial en las propiedades emisivas puesto que reduce las rutas de desactivación no radiativas asociadas con la captura en la superficie del electrón o el hueco generado después de la absorción de luz por el core. Con esta pasivación las

²⁴ Borchert, H.; Talapin, D. V.; McGinley, C.; Adam, S.; Lobo, A.; de Castro, A. R. B.; Möller, T.; Weller, H., High resolution photoemission study of CdSe and CdSe/ZnS core-shell nanocrystals. *The Journal of Chemical Physics* **2003**, *119*, 1800-1807.

propiedades ópticas del QD son mejoradas, debido entre otras causas a que el shell separa físicamente la superficie del core del medio. Durante el crecimiento del shell en las nanopartículas se produce un pequeño desplazamiento hacia el rojo (alrededor de 5-10 nm) en los espectros de absorción y emisión del core de CdSe. Otros tipos de CS con similar comportamiento son CdSe/CdS, CdTe/ZnS o ZnSe/ZnS, entre otros.

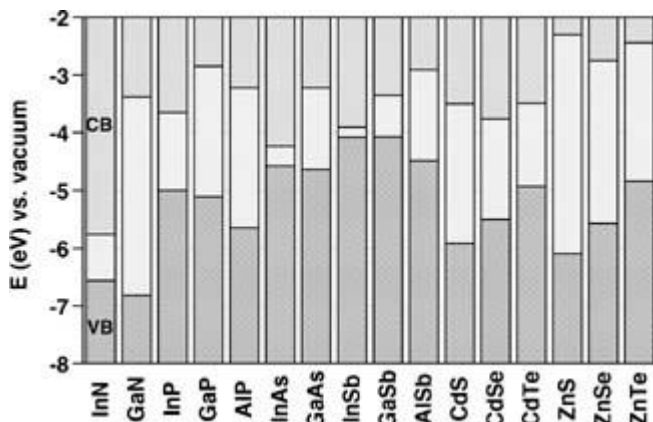


Figura 13. Niveles energéticos de semiconductores de los grupos 12-16. Adaptado con autorización. Copyright (2009)²⁵

En las nanopartículas semiconductoras de **tipo 2**, un extremo de la *bv* o la *bc* del material del shell se encuentra localizado en el interior de la banda prohibida del core, dando como resultado un escalonamiento de las bandas, generando una banda prohibida efectiva más pequeña. Este shell, produce

²⁵ Reiss, P.; Protière, M.; Li, L., Core/Shell Semiconductor Nanocrystals. *Small* **2009**, 5 (2), 154-168.

un importante desplazamiento de la emisión hacia el rojo. Un ejemplo de este tipo de CS son los de CdTe/CdSe o CdSe/ZnTe.

1.5.3. Efecto del ligando en las propiedades fotofísicas

Los ligandos orgánicos de la nanopartícula QD pueden pasivar la superficie, aumentar la estabilidad y podrían diseñarse para incrementar la solubilidad en el medio de reacción. Los ligandos son en parte responsables de las propiedades ópticas de la nanopartícula y pueden ayudar a dar mayores propiedades al sistema QD.

El ligando comúnmente usado en la síntesis de las nanopartículas de CdSe es el óxido de trisoctilfosfina (TOPO) y trisoctilfosfina (TOP) que, debido a la presencia de cadenas alquílicas, le confiere estabilidad y solubilidad en medio orgánico. Además, al no formar un enlace covalente con la nanopartícula, el ligando puede ser desplazado fácilmente por otros, permitiendo su posterior funcionalización. Las características básicas de conformación de un ligando están dadas por:

- 1.-) un grupo con alta afinidad a la superficie de los QDs
- 2.-) un grupo espaciador o “linker”
- 3.-) un grupo funcional (GF) o cadena que posea las propiedades fisico-químicas deseadas.

Distintos métodos pueden ser utilizados para modificar convenientemente la superficie y lograr la adecuada funcionalización del QD, como el intercambio de ligando, la encapsulación y la funcionalización directa²⁶ (**figura 14**).

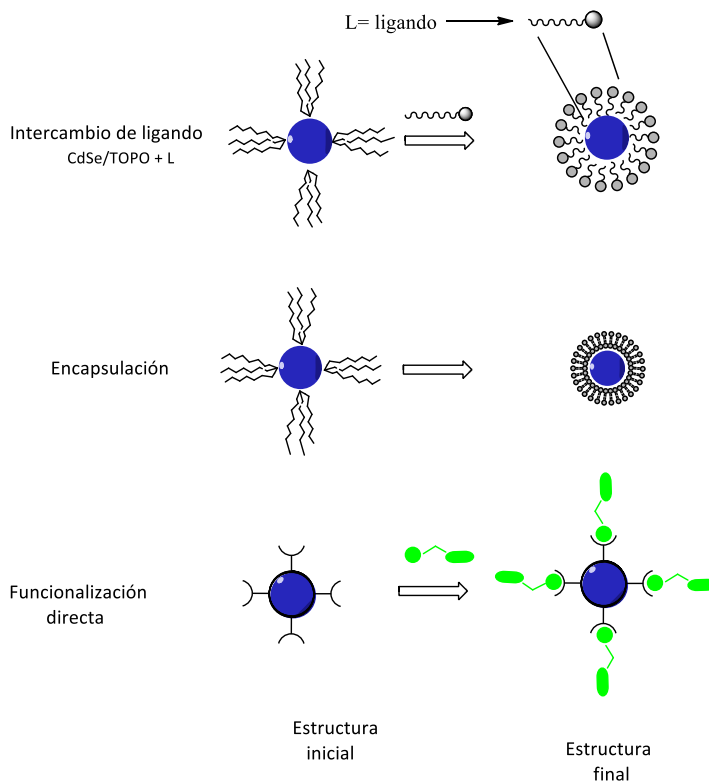


Figura 14. Estrategias de preparación de QDs con ligandos diferentes a los obtenidos en su síntesis inicial.

²⁶ Hammer, N. I.; Emrick, T.; Barnes, M. D., Quantum dots coordinated with conjugated organic ligands: new nanomaterials with novel photophysics. *Nanoscale Research Letters* **2007**, 2 (6), 282-290.

Diferentes tipos de grupos funcionales son capaces de interactuar o unirse a la superficie de los QDs, tales como amina, tiol, fosfina, ácidos carboxílicos, sulfonatos o lactonas, para ser utilizadas con fines analíticos, **figura 15**²⁷.

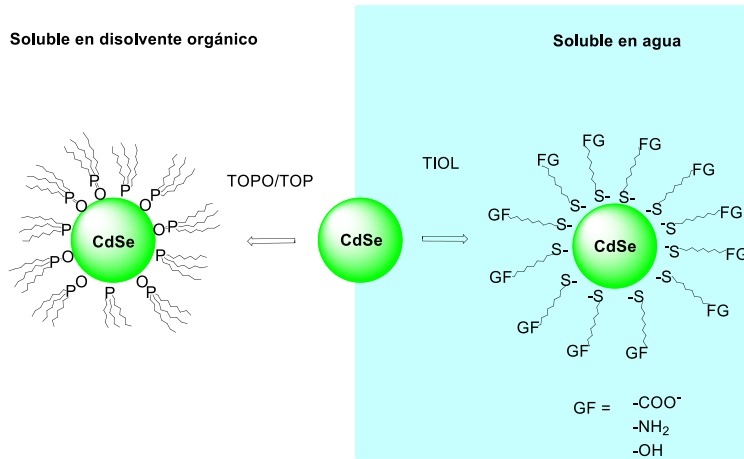


Figura 15. Funcionalización de los QD con diferentes ligandos.

Los tioles son el grupo orgánico más utilizado para pasivar los core de CdSe, debido a su fuerte unión a la superficie de la nanopartícula del QD. Es bien conocido que la adición de tioles, tanto alifáticos como aromáticos, a estos QD produce una desactivación de la fluorescencia, como se observa en **figura 16** para toluenotiol, tiofenol y 4-hidroxitiofenol. La desactivación de la emisión es causada por la transferencia del hueco (h^+), que se ha creado en la nanopartícula tras la excitación, a la molécula

²⁷ Qu, F.; Zhou, X.; Xu, J.; Li, H.; Xie, G., Luminescence switching of CdTe quantum dots in presence of p-sulfonatocalix [4] arene to detect pesticides in aqueous solution. *Talanta* **2009**, 78 (4), 1359-1363.

de tiol, debido a que el HOMO del tiol se encuentra entre los niveles de energía de la banda prohibida del QD CdSe. Es decir, la molécula se desactiva por procesos no radiativos. En el caso de CdTe QDs, el HOMO del tiol se encuentra por debajo de la banda de valencia del semiconductor, por lo que los tioles no desactivan su fluorescencia, **figura 17**²⁸.

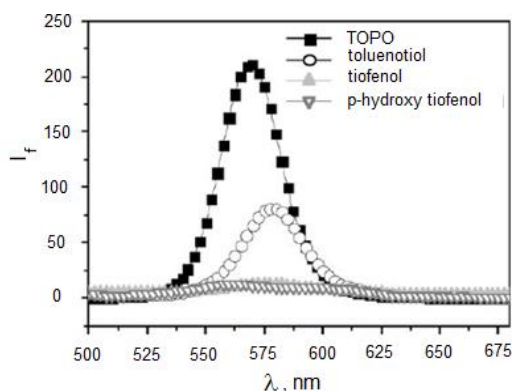


Figura 16. Espectros de emisión de los CdSe QDs mostrando el efecto del intercambio de TOPO por tioles aromáticos sobre las propiedades emisivas²⁹. **Adaptado con autorización. Copyright (2008)**

²⁸ Wuister, S. F.; de Mello Donegá, C.; Meijerink, A., Influence of Thiol Capping on the Exciton Luminescence and Decay Kinetics of CdTe and CdSe Quantum Dots. *The Journal of Physical Chemistry B* **2004**, *108*, 17393-17397.

²⁹ Liu, I. S.; Lo, H.-H.; Chien, C.-T.; Lin, Y.-Y.; Chen, C.-W.; Chen, Y.-F.; Su, W.-F.; Liou, S.-C., Enhancing photoluminescence quenching and photoelectric properties of CdSe quantum dots with hole accepting ligands. *Journal of Materials Chemistry* **2008**, *18* (6), 675-682.

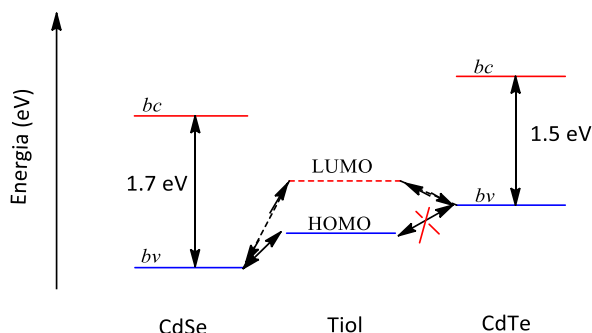


Figura 17. Posiciones relativas del band gap de QDs de CdSe y CdTe frente al HOMO del tiol²⁸. **Adaptado con autorización Copyright (2004)**

Previamente en el grupo de investigación se demostró que el intercambio de ligandos aminas de QDs de CdSe/ZnS por tioles, utilizando condiciones suaves de reacción, pueden aumentar la fluorescencia de los QD³⁰.

1.6. Nitrocompuestos Aromáticos

Los nitrocompuestos aromáticos (NA) constituyen un grupo de compuestos químicos orgánicos derivados del benceno y sus homólogos (tolueno y xileno), el naftaleno y el antraceno, por sustitución de uno o más átomos de hidrógeno por grupos nitro (NO₂).

³⁰ Aguilera-Sigalat, J.; Rocton, S.; Galian, R. E.; Pérez-Prieto, J., Fluorescence enhancement of amine-capped CdSe/ZnS quantum dots by thiol addition. *Canadian Journal of Chemistry* **2011**, *89* (3), 359-363.

Los NA más importantes desde el punto de vista industrial son el nitrobenzeno, el nitrotolueno, el dinitrotolueno, el trinitrotolueno (TNT), el tetrilo, los mononitroclorobenzenos, las nitroanilinas, los nitroclorotoluenos, el nitronaftaleno, el dinitrofenol, el ácido pícrico (trinitrofenol) y el dinitrocresol, **figura 18**. Estos compuestos se utilizan principalmente como disolventes o en la fabricación de explosivos, colorantes, pigmentos, insecticidas, textiles (poliamida resistente al calor: “Nomex”), plásticos, resinas, elastómeros (poliuretano), productos farmacéuticos, reguladores del crecimiento de las plantas y otras aplicaciones.

En general el grupo nitro es un sustituyente polar aceptor de densidad electrónica; fuertemente desactivador y director en la sustitución electrofílica aromática. En la práctica casi todos los hidrocarburos aromáticos pueden nitrarse por calentamiento suave con una mezcla de HNO₃ concentrado y H₂SO₄ concentrado “mezcla nitrante”³¹; la posición en la que se produce la nitración depende del esquema particular de sustitución de cada compuesto.

³¹ Se pueden utilizar otros agentes de nitración como ácido nítrico fumante (con 6-12% NO₂), tetrafluoroborato de nitronio, NO₂⁺[BF₄]⁻, y nitrato de acetilo, CH₃COONO₂, que puede ser explosivo en condiciones suaves.

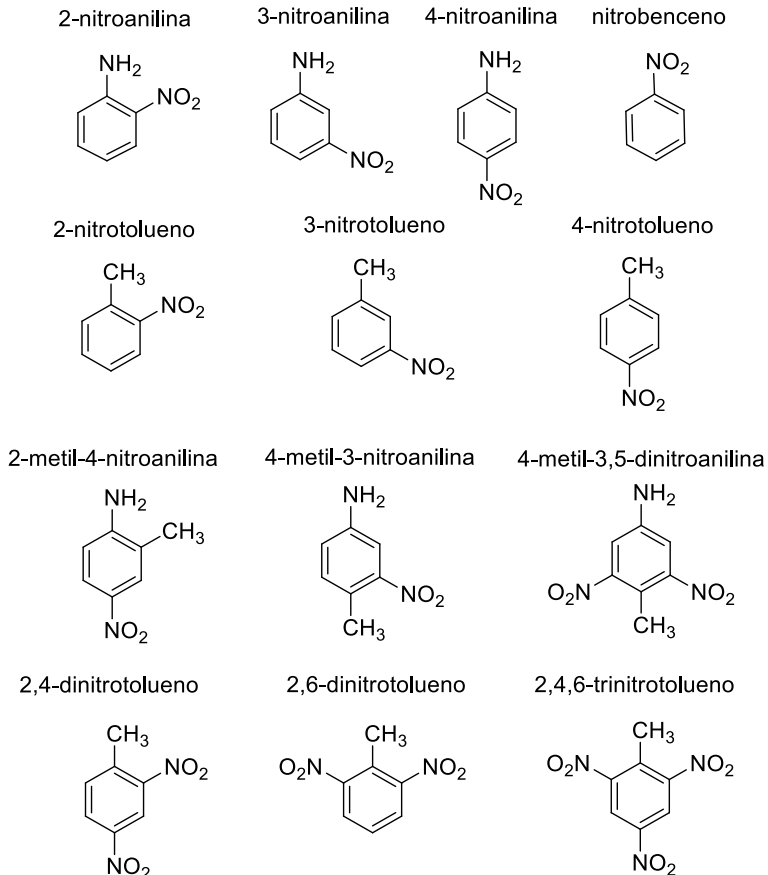


Figura 18. Distintas moléculas sustituidas del benceno, utilizadas en esta investigación.

Los bencenos di-sustituidos han sido utilizados como moléculas modelo para investigaciones teóricas y experimentales debido a sus propiedades de transferencia de carga; por ejemplo, la molécula de 4-NA con un grupo donador de electrones (-NH₂) unido al anillo aromático fenilo y un grupo aceptor de electrones (-NO₂) en el otro extremo, **figura 19**. Esta

molécula se utiliza para realizar estudios de transferencia de carga de reacciones y en gran variedad de procesos fotofísicos. La fotoexcitación de 4-NA muestra que inicialmente ocurre una migración de la carga desde el grupo nitro al grupo amino, es decir induce un cambio en el momento dipolar de la molécula³². El gran cambio en el momento dipolar de la 4-NA después de la excitación hace que las propiedades intramoleculares sean muy susceptibles a respuestas dieléctricas del entorno.

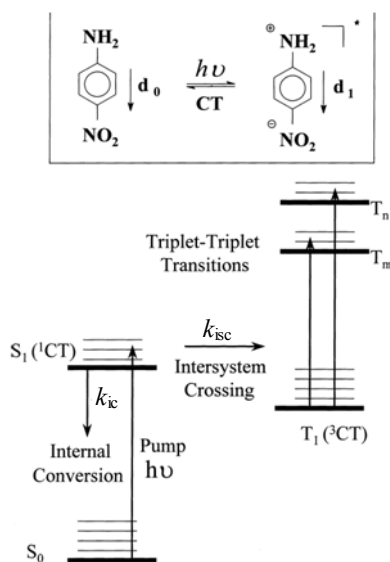


Figura 19. Migración de carga debido a la fotoexcitación³².

Adaptado con autorización Copyright (1998).

³² Thomsen, C. L.; Thøgersen, J.; Keiding, S. R., Ultrafast Charge-Transfer Dynamics: Studies of p-Nitroaniline in Water and Dioxane. *The Journal of Physical Chemistry A* **1998**, *102* (7), 1062-1067.

1.7. Perspectivas del trabajo

La desactivación de la fluorescencia de las especies emisivas del pireno (monómero-excímero)³³ por un desactivador han sido ampliamente estudiadas y pueden analizarse según la **figura 20**. Los fenómenos de desactivación son utilizados como métodos analíticos para determinar la existencia de selectividad en el reconocimiento de analitos.

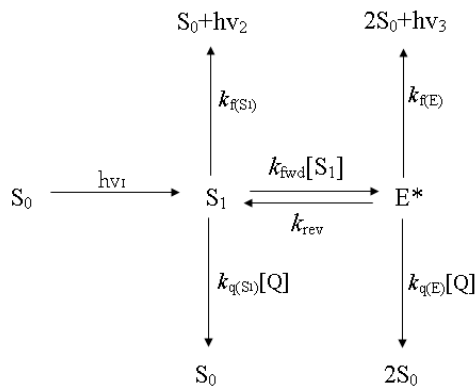


Figura 20. Mecanismo de desactivación, S_0 (estado fundamental), S_1 (singlete), E (excímero) k_q , (constante de desactivación bimolecular), Q (desactivador), k_f (constante de fluorescencia).

Scaiano y colaboradores³³ utilizaron concentraciones de pireno 3 mM, demostrando que el monómero del pireno muestra gran selectividad hacia compuestos deficientes de electrones (5-nitro-*m*-xileno), y que la desactivación del

³³ Focsaneanu, K.-S.; Scaiano, J. C., Potential analytical applications of differential fluorescence quenching: pyrene monomer and excimer emissions as sensors for electron deficient molecules. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2005**, 4 (10), 817-821.

excímero (**figura 21**), es la combinación de la desactivación de los dos estados excitados, es decir la desactivación del monómero y la del excímero

Se sugiere la potencial aplicación del excímero en la detección de moléculas similares a los explosivos nitrados como por ejemplo 2,4,6-trinitrotolueno (TNT). Sin embargo, uno de los inconvenientes de este sistema radica en el uso de altas concentraciones de fluoróforo para observar la formación del excímero.

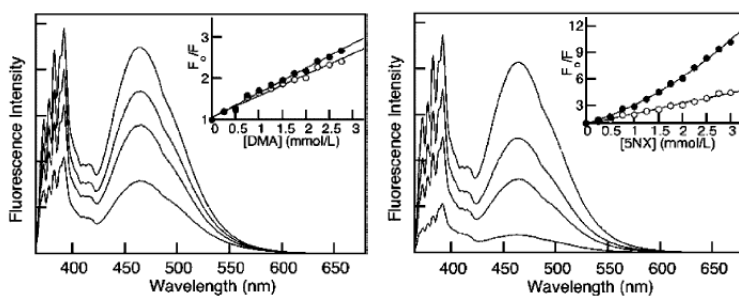


Figura 21. Espectros de desactivación de la emisión de fluorescencia de pireno, (izquierda) por N,N dimetilnilina [DMA]; (derecha) por 5-nitro-*m*-xileno [5NX]. Insertados: se representa la contribución de fluorescencia en presencia de concentraciones crecientes del quencher el monómero (○) y el excímero (●)³³. **Adaptado con autorización. Copyright (2005)**

Credi y colaboradores³⁴ han reportado sistemas de nanopartículas del tipo core-shell CdSe/ZnS funcionalizadas con pireno, observándose solo la emisión de fluorescencia del monómero del pireno y la nanopartícula; (*es decir no se observó la emisión del excímero bajo estas condiciones, figura 22*). Este sistema se utilizó como sensor ratiométrico de oxígeno, basado en la independencia de la fluorescencia de la nanopartícula en presencia de oxígeno.

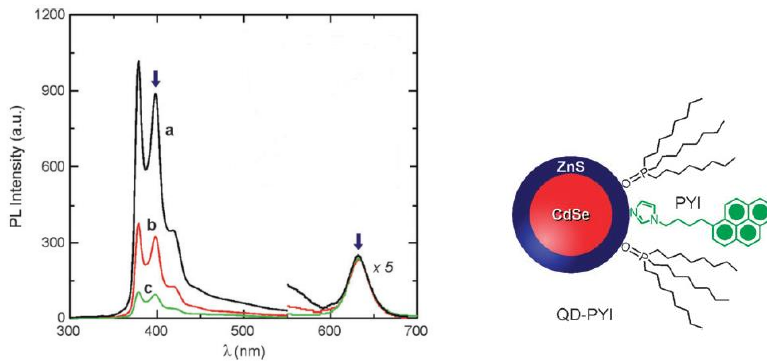


Figura 22. Esquema de un QD@Py utilizado como sensor 0 (a), 0.213 (b) y 1.013 (c) bares de O₂³⁴. **Adaptado con autorización. Copyright (2011)**

Por otra parte, Tongxin Wang, et al³⁵ sintetizaron nanopartículas de oro decoradas con ligandos de pireno,

³⁴ Amelia, M.; Lavie-Cambot, A.; McClenaghan, N. D.; Credi, A., A ratiometric luminescent oxygen sensor based on a chemically functionalized quantum dot. *Chemical Communications* **2011**, 47 (1), 325-327.

³⁵ Wang, T.; Zhang, D.; Xu, W.; Yang, J.; Han, R.; Zhu, D., Preparation, characterization, and photophysical properties of alkanethiols with pyrene units-capped gold nanoparticles: Unusual fluorescence enhancement for the aged solutions of these gold nanoparticles. *Langmuir* **2002**, 18 (5), 1840-1848.

observando que la emisión de fluorescencia del pireno variaba con el tiempo. Así, la intensidad de emisión del excímero aumentaba con el transcurso de horas tras la síntesis, fenómeno atribuido a la libertad de movimiento de las cadenas alquílicas y reorientación del pireno en las nanopartículas de oro, **figura 23**.

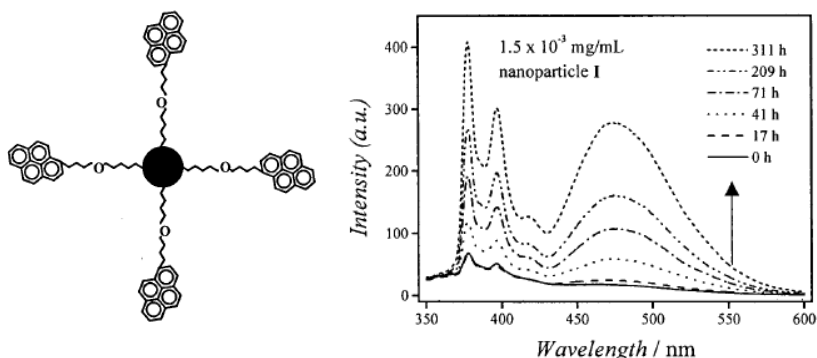


Figura 23. Nanopartículas de oro funcionalizadas con pireno³⁵.

Adaptado con autorización Copyright (2002).

Wei Chen y colaboradores¹⁸ funcionalizaron nanopartículas de rutenio con 1-alilpireno, las cuales exhiben únicamente la emisión del monómero. Estas nanopartículas fueron estudiadas como sensores de nitrocompuestos aromáticos, observando una mayor sensibilidad para las moléculas con mayor nitración (en particular para el trinitrotolueno, TNT). Por lo tanto, el proceso de reconocimiento se atribuye a procesos de transferencia de carga del pireno, rico en electrones, a los nitrocompuestos aromáticos, pobres en electrones, **figura 24**.

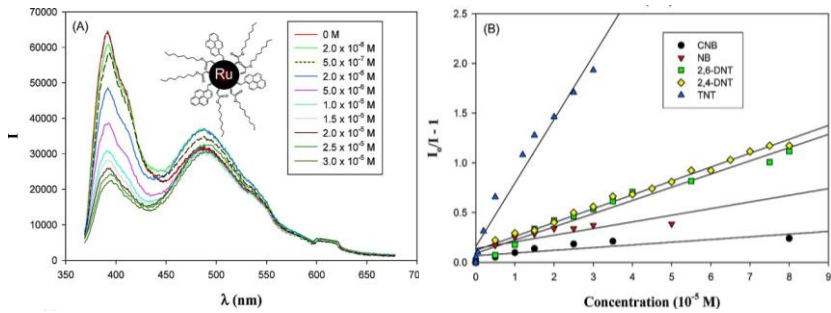


Figura 24. Desactivación de la emisión de las nanopartículas de rutenio disueltas en *N,N*-dimetilformamida por adición de TNT (concentración de pireno: $19 \mu\text{M}$)¹⁸. Adaptado con autorización Copyright (2002).



2. OBJETIVOS



Teniendo en cuenta la falta en la bibliografía de nanopartículas rodeadas de elevada concentración de pireno y el interés de la formación del excímero como herramienta de reconocimiento, se planteó i) aprovechar la alta relación superficie/volumen de nanopartículas del tipo QD como soporte globular que permite anclar un gran número de ligandos orgánicos y facilitar así la formación de excímeros a bajas concentraciones de pireno total (*objetivo 1* de la presente memoria) y ii) estudiar su potencial en el reconocimiento selectivo de compuestos nitrados (*objetivo 2*).

Existen ejemplos en la literatura del uso de algunos compuestos aromáticos fluorescentes tales como pireno, purpurina, benzo(*k*)fluoranteno, verde malaquita, entre otros como sensores de aminas aromáticas^{15, 36}. Sin embargo, no existe un análisis sistemático de los procesos de desactivación involucrados. Se ha sugerido la desactivación de la fluorescencia del pireno por compuestos a través de procesos de naturaleza dinámica o estática. No se ha obtenido una buena correlación entre la capacidad aceptora de electrones de los nitrocompuestos y la eficiencia como desactivador de la

³⁶ Patra, D.; Mishra, A. K., Fluorescence quenching of benzo[k]fluoranthene in poly(vinyl alcohol) film: a possible optical sensor for nitro aromatic compounds. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2001**, 80 (3), 278-282.

fluorescencia del pireno³⁷. Se sugiere que los procesos de desactivación pueden ocurrir a través de transferencia electrónica o de transferencia de carga.

Por ello, se propuso estudiar los mecanismos de desactivación de la fluorescencia del pireno por nitroanilinas. En este sentido, se planteó analizar los fenómenos de desactivación del cromóforo pireno y 1-metilpireno por nitroanilinas no sustituidas (2-, 3- y 4-NA) metilnitroanilinas (4-metil-3-nitroanilina, 4-M-3-NA y 2-metil-4-nitroanilina, 2-M-4-NA) y una dinitroanilina (4-metil-3,5-dinitroanilina, 4-M-3,5-DNA) en tolueno y 1,4-dioxano, **figura 25, (objetivo 3)**.

Es conocido que la fluorescencia es una poderosa herramienta analítica para la detección de patrones moleculares y es utilizada ampliamente como técnica en áreas de la medicina, biología y química³⁸. Además ha probado ser una técnica altamente competitiva (muy sensible, de fácil operación, y con una buena relación costo/beneficio). Sin embargo, la mayoría de sondas fluorescentes desarrolladas utiliza una única

³⁷ Jbarah, A.; Holze, R., A comparative spectroelectrochemical study of the redox electrochemistry of nitroanilines. *Journal of Solid State Electrochemistry* **2006**, *10* (6), 360-372.

³⁸ (a) Liu, T.; Liu, X.; Spring, D. R.; Qian, X.; Cui, J.; Xu, Z., Quantitatively Mapping Cellular Viscosity with Detailed Organelle Information via a Designed PET Fluorescent Probe. *Scientific Reports* **2014**, *4*, 5418-5425; (b) Minami, T.; Esipenko, N. A.; Akdeniz, A.; Zhang, B.; Isaacs, L.; Anzenbacher, P., Multianalyte Sensing of Addictive Over-the-Counter (OTC) Drugs. *Journal of the American Chemical Society* **2013**, *135* (40), 15238-15243.

señal. El uso de múltiples canales fluorescentes es de gran interés para:

- Reducir los errores debido a los falsos positivos y sus interferentes.
- Realizar simultáneamente la detección y la eventual cuantificación de los analitos, entre otras aplicaciones.

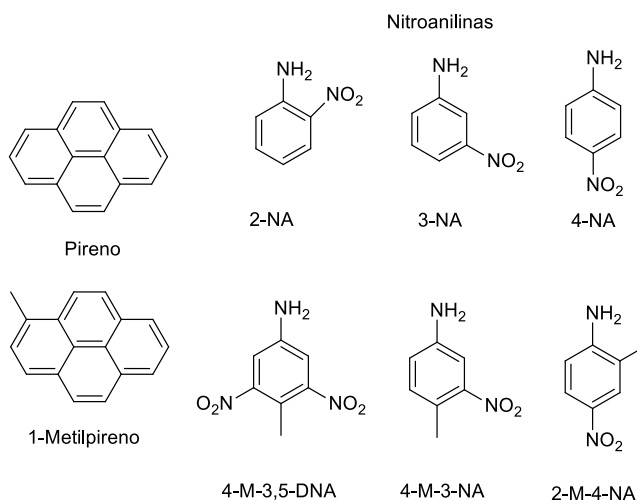


Figura 25. Estructura de los pirenos y las nitroanilinas evaluadas.

Se proyectó combinar las propiedades emisivas del pireno con las propiedades emisivas de la nanopartícula, en un sistema que utilizara estas nanopartículas no solo por sus propiedades ópticas, sino por su elevada relación superficie/volumen. Por lo tanto, se plantea analizar las propiedades emisivas de la fluorescencia de un sistema core-shell@pireno- (CS@Py) en las que se evite la superposición de las señales emisivas del monómero y el excímero del pireno, con la de la nanopartícula

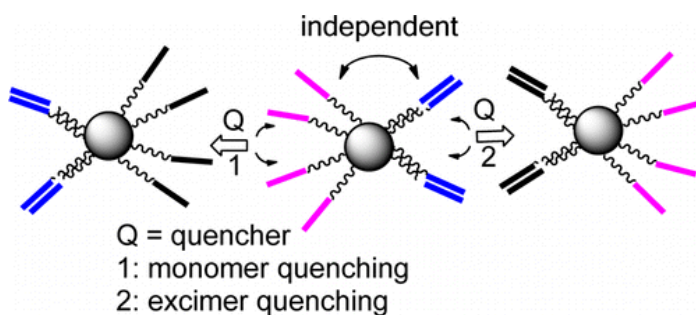
(*objetivo 4*), y evaluar su uso como una herramienta analítica de compuestos aromáticos. Los objetivos planteados se resumen:

- **Objetivo 1.** Diseñar, sintetizar y caracterizar nanopartículas semiconductoras híbridas del tipo CdSe (quantum dot) funcionalizadas con pireno CdSe@Py.
- **Objetivo 2.** Estudiar la capacidad del sistema (quantum dot-pireno) QD@Py como sensor de nitrocompuestos.
- **Objetivo 3.** Estudiar el mecanismo de desactivación del pireno por nitronilinas utilizando fluorescencia en estado estacionario y resuelta en el tiempo.
- **Objetivo 4.** Sintetizar nanopartículas semiconductoras híbridas usando QDs de CdSe/ZnS funcionalizadas con pireno (CS@Py) y evaluar su actividad como sensor de triple canal de nitrocompuestos.

3. RESUMEN DE ARTÍCULOS PUBLICADOS RELACIONADOS CON LA TESIS

3-1. Pyrene Functionalised Nanoparticles: Two Independent Sensors-the excimer and the Monomer

Carlos E. Agudelo-Morales, Raquel E. Galian, and Julia Pérez-Prieto



Anal. Chem., **2012**, *84* (18), 8083–8087

Adaptado con permiso Copyright © (2004) American Chemical Society.

“Nanopartículas Funcionalizadas con Pireno: Dos Sensores Independientes, Monómero y el Excímero”

Las nanopartículas (NP) esféricas metálicas y semiconductoras exhiben una alta relación superficie/volumen. Estos materiales están generalmente recubiertos por ligandos orgánicos los cuales tienen en un extremo un grupo de anclaje (formado por átomos de azufre, fósforo o nitrógeno) que presenta afinidad por la superficie de la NP. El otro extremo del ligando puede ser utilizado para agregarle funcionalidad a la periferia de la NP. Esta estrategia ha sido implementada para la preparación de soluciones coloidales de pireno-funcionalizado con NPs de oro y QDs del tipo core y core-shell³⁹. En el primer caso exhiben la emisión del M y el E si el pireno está anclado a la superficie de la NP por una cadena larga y flexible^{18, 34, 39}. Nuestro propósito fue diseñar un sistema híbrido NP-pireno y analizar su uso como sensor fluorescente basado en la desactivación de la emisión de las especies emisivas del pireno.

En este trabajo se propuso la obtención de soluciones coloidales altamente diluidas de pireno pero con alta concentración local del mismo utilizando NPs de CdSe como

portador (QD@Py) y evaluar la capacidad del monómero y del excímero del pireno como sensores fluorescentes.

3-1.1. Síntesis del ligando 11-mercaptoundecanoato de 4-(pirenil-1-il) butilo (Py-L₁-SH).

La síntesis del ligando Py-L₁-SH se realizó mediante una reacción de esterificación, siguiendo la metodología descrita en la literatura por Hisashi Yamamoto et al⁴⁰. A la disolución de 1-pirenobutanol y ácido 11-mercaptoundecanoico en tolueno anhidro se adicionó cloruro de hafnio HfCl₄·THF (1:2) (como catalizador). La mezcla se calentó a reflujo durante 48 horas en atmósfera de nitrógeno (**figura 1**). El producto de reacción fue separado por cromatografía de columna utilizando acetato de etilo y hexano como eluyente.

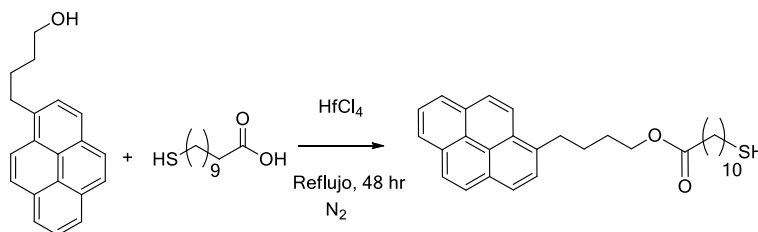


Figura 1. Síntesis del ligando Py-L₁-SH.

⁴⁰ Ishihara, K.; Ohara, S.; Yamamoto, H., Direct Condensation of Carboxylic Acids with Alcohols Catalyzed by Hafnium(IV) Salts. *Science* **2000**, *290* (5494), 1140-1142.

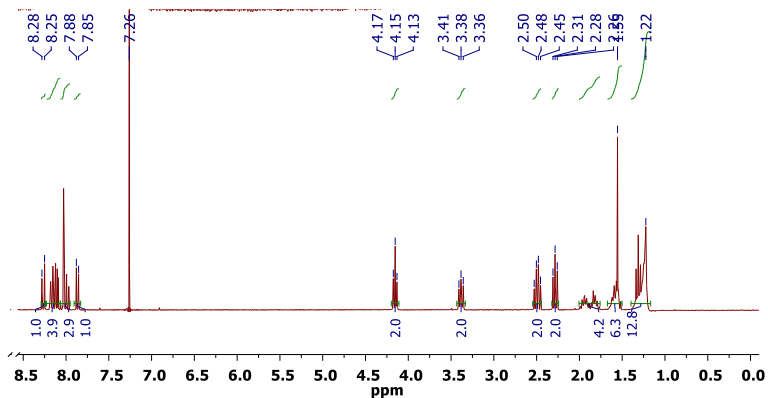


Figura 2. Espectro de ^1H -RMN del ligando Py-L₁-SH.

El espectro de ^1H -RMN de Py-L₁-SH, **figura 2** muestra señales entre 7,7 y 8,3 ppm, correspondientes al anillo aromático del pireno, un triplete a 4,1 ppm del $-\text{CH}_2\text{-O}$, un triplete a 3,3 ppm, que corresponde al CH_2 -pireno, y un cuadruplete a 2,5 ppm del $-\text{CH}_2\text{-SH}$. Los protones del CH_2 en α -al grupo mercapto se acoplan con los protones del metileno vecino, así como con el protón del grupo mercapto. El triplete a 2,2 ppm es debido al $\text{CH}_2\text{-C=O}$ y por último, las señales entre 1,2 y 2,0 ppm pertenecen al resto de la cadena alquímica.

3-3.1. Síntesis y caracterización de las nanopartículas semiconductoras de QD@TOPO

Las nanopartículas semiconductoras del tipo CdSe (quantum dots, QDs) se sintetizaron según la metodología reportada por Peng et al ⁴¹, **figura 3**, con algunas modificaciones. En un balón de tres bocas se adicionó una mezcla de 2,3 mmol de CdO (óxido de cadmio), 0,7 mmol TDAP (ácido tetradecilfosfonico) y 9,1 mmol de TOPO (óxido de trioctilfosfina) y se calentó gradualmente hasta alcanzar 320°C en atmósfera de N₂. Se mantuvo la temperatura durante aproximadamente 10 minutos, hasta obtener una disolución transparente. Entonces, la temperatura se bajó a 270°C, y se inyectó rápidamente 1,2 ml de una disolución SeTOP (0,3 mmol de Selenio y 3,4 mmol de trioctilfosfina, en atmósfera de N₂). Tras la nucleación de las nanopartículas y cuando la reacción se tornó de una coloración naranja, los nanocristales fueron precipitados y purificados en MeOH (metanol) frío, proceso repetido 3 veces, y la muestra fue centrifugada para eliminar el exceso de reactivos. Finalmente los QDs sintetizados se dispersaron en tolueno y se almacenaron en nevera en viales ámbar de 5 ml.

⁴¹ Peng, Z. A.; Peng, X., Formation of High-Quality CdTe, CdSe, and CdS Nanocrystals Using CdO as Precursor. *Journal of the American Chemical Society* **2001**, *123* (1), 183-184.

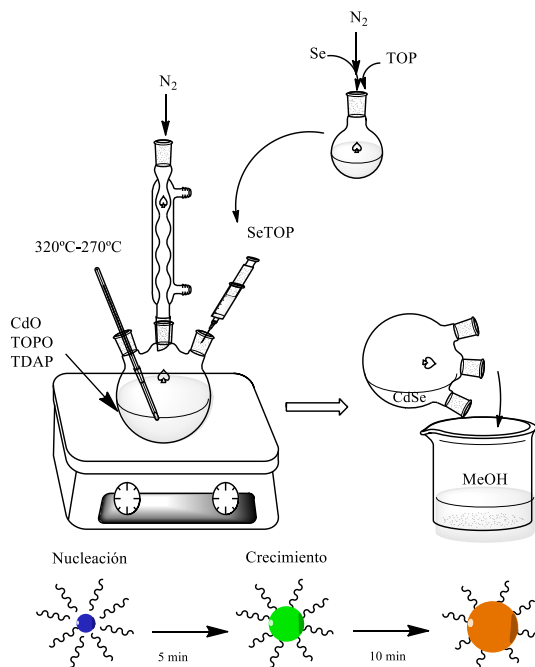


Figura 3. Ilustración de la síntesis de los QD@TOPO.

Siguiendo esta metodología se obtienen nanopartículas que presentan ligandos de óxido de tris-octilfosfina (TOPO) y son denominadas QD@TOPO. Los QDs se caracterizaron por espectroscopía de absorción UV-Vis (que permite estimar el tamaño de las NPs y concentración de la muestra) y espectroscopía de emisión de fluorescencia, **figura 4**.

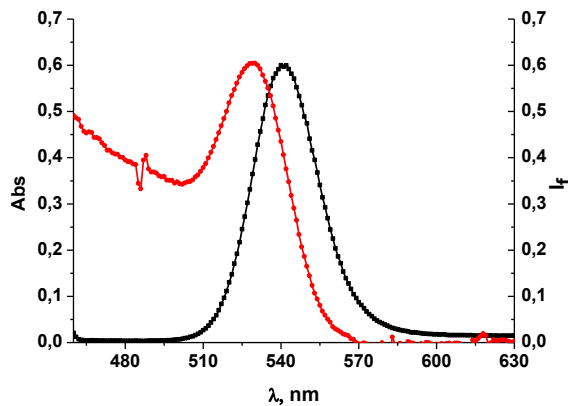


Figura 4. Espectros normalizados de absorción (●) y de emisión (■) del QD-TOPO en tolueno ($\lambda_{\text{ex}}=450$ nm).

A partir del máximo de absorción del pico del excitón, se ha podido estimar el tamaño promedio (diámetro, D , nm) de la nanopartícula **tabla 1**, el coeficiente de extinción molar ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$) del material y la concentración de la muestra, aplicando las siguientes **ecuaciones 1 y 2**.⁴²

$$(D) = 1,6122 * 10^{-9} \lambda^4 - 2,6575 * 10^{-6} \lambda^3 + 1,6242 * 10^{-3} \lambda^2 - 0,4277 \lambda + 41,57$$

Ecuación 1. Ecuación para estimar el diámetro de la nanopartícula.

$$\epsilon = 5857 * D^{2,65}$$

Ecuación 2. Ecuación para estimar el coeficiente de extinción molar de la nanopartícula.

⁴² Yu, W. W.; Qu, L.; Guo, W.; Peng, X., Experimental Determination of the Extinction Coefficient of CdTe, CdSe, and CdS Nanocrystals. *Chemistry of Materials* **2003**, *15* (14), 2854-2860.

Tabla 1. Resumen de las propiedades del QD@TOPO sintetizado.

λ_{abs} (nm)	D nm	ϵ ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	λ_{emi} (nm)	R.C Φ_r	FWHM (nm)
529	2,7	8004	540	5,7	27

El pico de emisión obtenido a 540 nm y la anchura a la altura media del pico (FWHM) de 30 nm, indican una distribución pequeña de tamaños de QDs. Este hecho se comprobó por microscopía electrónica de alta resolución, **figura 5**. La imagen de HRTEM muestra una alta homogeneidad de la muestra con un valor promedio de diámetro de $2,4 \pm 0,4$ nm.

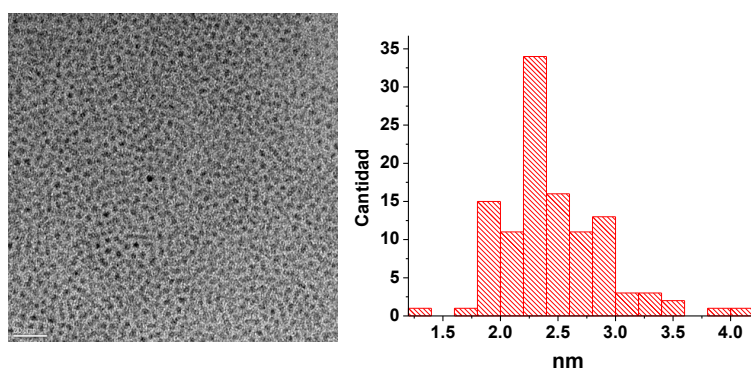


Figura 5. Nanopartículas de CdSe sintetizadas. Histograma distribución de tamaños (derecha). Imagen obtenida por microscopía electrónica de alta resolución (HRTEM), escala 20 nm, (izquierda).

3-1.2. Síntesis y caracterización de las nanopartículas semiconductoras de QD@Py

Las nanopartículas QD@TOPO previamente sintetizadas se funcionalizaron con 11-mercaptoundecanoato de 4-(pirenil-1-il) butilo obteniéndose unas QDs decoradas con unidades de pireno (QD@Py). La funcionalización se realizó mediante el método de intercambio de ligando, **figura 6**.

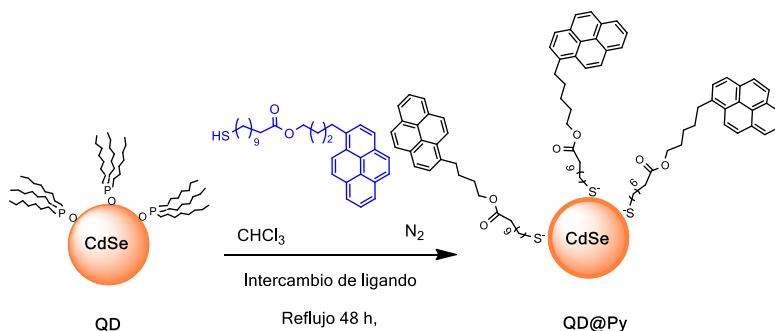


Figura 6. Esquema representativo de la funcionalización de la nanopartícula con el ligando Py-L₁-SH, para obtener QD@Py.

Intercambio de ligandos

El grupo –SH presenta una gran afinidad por la superficie de los QDs. La reacción se realizó calentando el QD@TOPO con el ligando Py-L₁-SH (relación molar Py-L₁-SH/QD= 3375/1) en cloroformo a reflujo durante 48 horas, en ausencia de luz y en atmósfera de nitrógeno.

Posteriormente, las nanopartículas se precipitaron en metanol frío y se centrifugaron, repitiéndose este proceso tres veces. La incorporación del ligando en la superficie del QD fue detectada por ^1H -RMN y espectroscopía de absorción (**figuras 7 y 8**). En el espectro de ^1H -RMN del QD@Py se observa un ensanchamiento así como un leve desplazamiento de las señales hacia campo bajo en relación con las del ligando libre. Estos datos indican una fuerte unión del ligando a la superficie de la nanopartícula. Además, se observan señales definidas que corresponden a la oxidación del tiol a disulfuro (tripleto 2,65 ppm). El disulfuro es un producto minoritario.

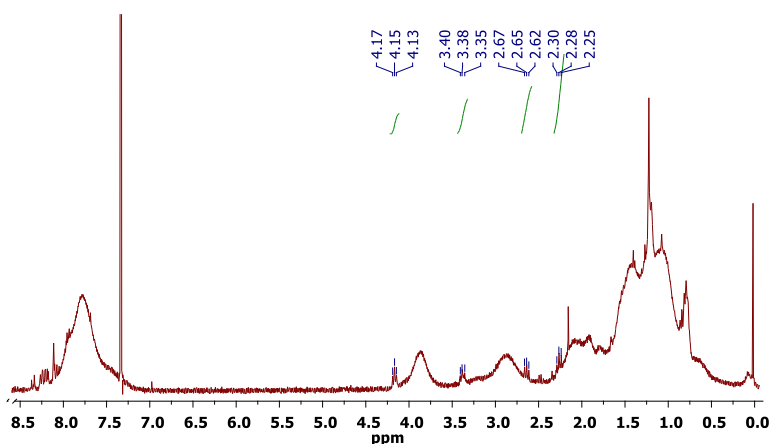


Figura 7. Espectro de ^1H -RMN de la Np funcionalizada con el ligando Py- L_1 -SH.

El espectro de absorción del QD@Py (**figura 8**) muestra las bandas típicas del pireno entre 300 y 380 nm y hacia el rojo el pico del excitón de la nanopartícula. A partir del pico del primer excitón a 529 nm se estimó un tamaño de nanopartícula

3. RESUMEN DE ARTÍCULOS PUBLICADOS RELACIONADOS CON LA TESIS

de 2,7 nm para las nanopartículas de QD@Py. Esto indica que no hay una variación significativa del tamaño por sustitución del ligando TOPO por el Py-L₁-SH. Además, a partir del espectro de absorción considerando el coeficiente de extinción molar del ligando y del QD, se pudo estimar la relación molar, Py-L₁-SH/QD \approx 40/1.

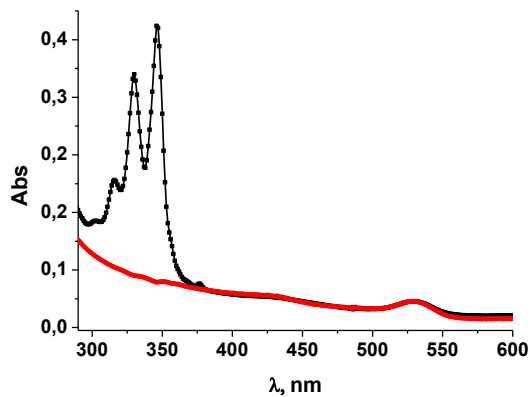


Figura 8. Espectro de absorción en tolueno del QD-TOPO [1×10^{-6} M] (●) y QD@Py [1×10^{-6} M] (■).

Las imágenes de microscopía de transmisión de alta resolución (HRTEM) muestran el tamaño de la nanopartícula resultante, **figura 9**. El histograma indica un tamaño de $2,4 \pm 0,4$ nm calculado con el software Image J.

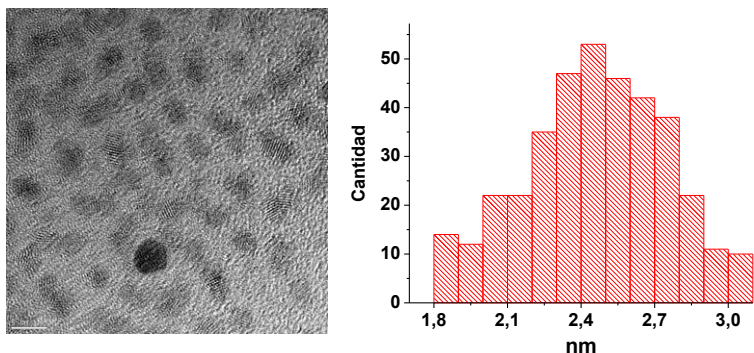


Figura 9. Imagen de las nanopartículas de QD@Py obtenida por microscopía electrónica de alta resolución (HRTEM) (Izquierda). Histograma distribución de tamaños (derecha).

3-1.3. Estudios fotofísicos de las nanopartículas funcionalizadas

Las medidas de fluorescencia en estado estacionario para el QD@Py se realizaron en tolueno. El máximo de fluorescencia se observa a 543 nm con un (FWHM) de 40 nm. Se detectó una drástica desactivación de la emisión del QD tras el intercambio de ligandos TOPO por ligandos tiol (**figura 10**), lo cual ha sido atribuido a la transferencia del hueco (h^+) del QD que se ha creado en la nanopartícula tras la excitación, a la molécula de tiol⁴³.

⁴³ (a) Bullen, C.; Mulvaney, P., The effects of chemisorption on the luminescence of CdSe quantum dots. *Langmuir* **2006**, *22* (7), 3007-3013; (b) Munro, A. M.; Jen-La Plante, I.; Ng, M. S.; Ginger, D. S., Quantitative study of the effects of surface ligand concentration on CdSe nanocrystal photoluminescence. *The Journal of Physical Chemistry C* **2007**, *111* (17), 6220-6227.

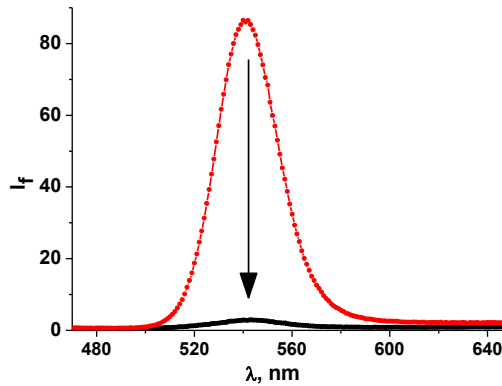
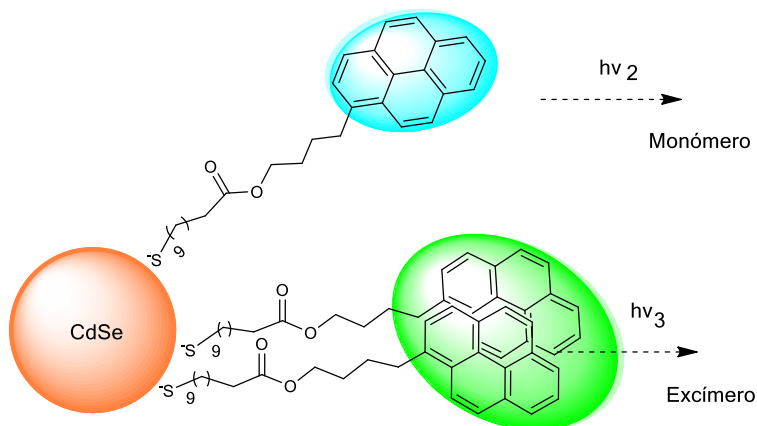


Figura 10. Espectros de emisión $\lambda_{\text{ex}}=450$ nm, de QD-TOPO, ($\Phi=5,7$ %, ●) y el QD@Py (■), en tolueno, N_2 .

En cuanto a la medida de fluorescencia de las unidades de pireno de QD@Py, se prepararon dos disoluciones con la misma concentración de pireno, una de Py- L_1 -SH y otra de QD@Py. Para esto las dos disoluciones se ajustaron a la misma absorbancia de pireno a 355 nm ($Abs=0,4$), teniendo en cuenta la absorción del CdSe. En la **figura 11**, se representa esquemáticamente la nanopartícula funcionalizada con unidades de pireno y las especies fluorescentes del pireno. El espectro de emisión en nitrógeno de la nanopartícula funcionalizada se comparó con la del Py- L_1 -SH (**figura 12**, izquierda).



QD@Py

Figura 11. Esquema representativo del QD@Py y de las especies responsables de la emisión del sistema híbrido.

Mientras que el Py-L₁-SH muestra únicamente la emisión del monómero (bandas definidas a 376, 396 y 417 nm), el QD@Py presenta una nueva emisión correspondiente al excímero (banda ancha alrededor de 480 nm). La nanopartícula reduce fuertemente el rendimiento cuántico global de la fluorescencia del pireno (en un 89 %), este efecto también se aprecia en presencia de oxígeno⁴⁴ donde la fluorescencia del pireno es parcialmente desactivada, **figura 12**.

Los espectros de emisión del sistema híbrido se obtuvieron para muestras en atmósfera de nitrógeno excitando a $\lambda_{exc} = 337$ nm, las bandas del monómero se encuentran a 376,

⁴⁴ Kollár, J.; Hrdlovič, P.; Chmela, Š., Spectral properties of bichromophoric pyrene derivatives: Monomer vs. excimer fluorescence. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2010**, *214* (1), 33-39.

396 y 417 nm y la banda del excímero presenta su máximo a 480 nm (**figura 13-A**)

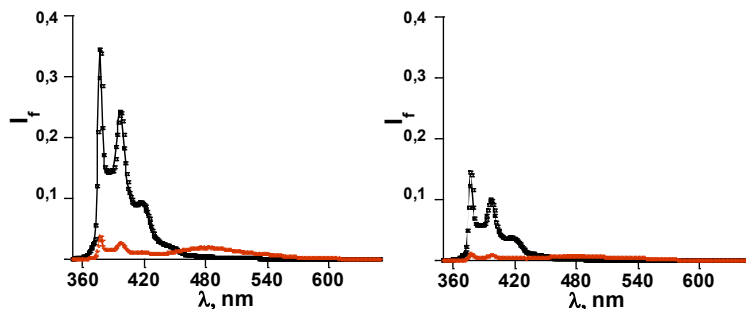


Figura 12. Espectros de fluorescencias de Py-L₁-SH (■ 0,35 μM) y de QD@Py (■ 1 μM) en tolueno ajustados a la misma absorbancia a $\lambda_{exc}=335$ nm. Izquierda en atmosfera de N₂, derecha en aire.

Teniendo en cuenta que el pequeño “hombro” a 540 nm corresponde a la emisión del QD, el espectro de emisión del excímero del pireno en QD@Py es análogo al excímero formado en Au@Py (**Figura 13-B**).

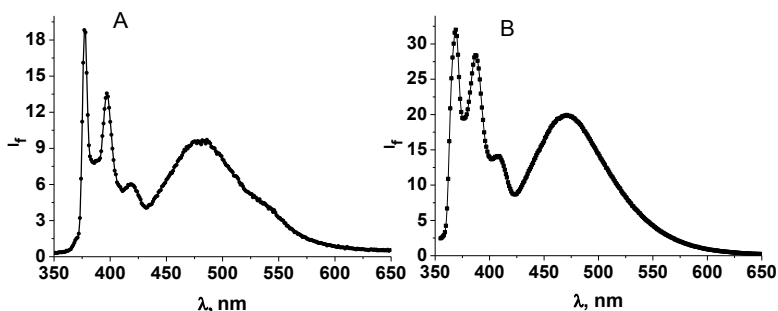


Figura 13. A-Espectro de fluorescencia $\lambda_{exc}=337$ nm de QD@Py. B-Espectro de fluorescencia ($\lambda_{exc}=335$ nm) de Np Au@Py tamaño 3.2 nm, N₂.

Según las estimaciones, la concentración de pireno por unidad de NP es el equivalente a 40 unidades por cada NP, comparativamente, concentraciones equivalentes (40 μM absorbancia 0,3) de Py-L₁-SH exhibe exclusivamente la emisión del monómero, **figura 14**.

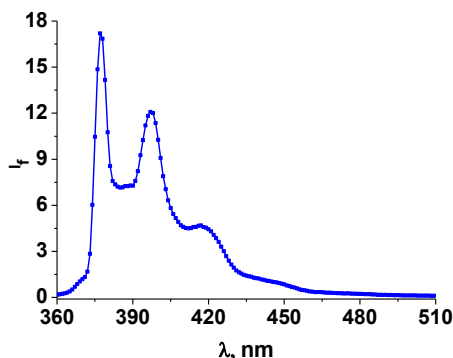


Figura 14. Espectro de fluorescencia $\lambda_{exc}=335$ de 40 μM Py-L₁-SH.

Aunque la emisión del pireno se redujo en un 30 % por la funcionalización con el QD, esta intensidad de fluorescencia es suficiente para permitir el uso de este sistema híbrido en la detección de compuestos nitrados. Se deduce que la emisión del excímero de QD@Py fue principalmente producida por las interacciones de las unidades del pireno ancladas a la NP.

Los estudios de fluorescencia resueltos en el tiempo de QD@Py mostraron una cinética de decaimiento del monómero que se ajusta a dos tiempos de vida; uno corto de ≈ 10 ns con una contribución del 62% y otro de ≈ 108 ns con una contribución de 38%, **figura 15**.

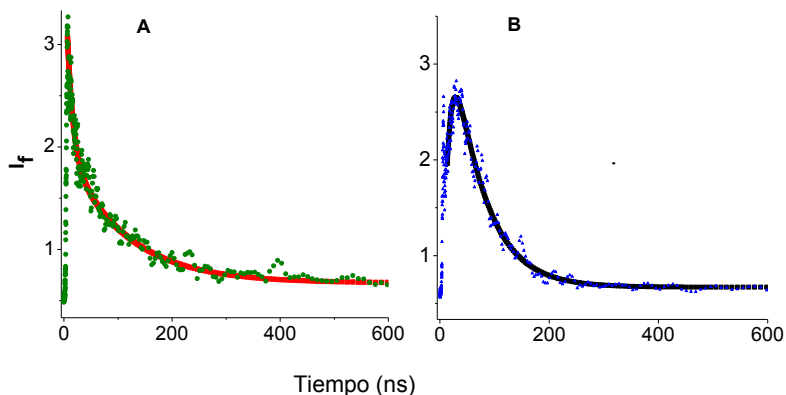


Figura 15. Cinéticas de decaimiento: **A**- Monómero QD@Py $\lambda_{exc}=337$ nm; λ_{emi} 389 nm (\blacktriangle) y **B** el Excímero λ_{emi} 475 nm (\blacktriangledown); en tolueno, y atmósfera de N_2 .

El tiempo de vida estimado para el excímero fue de ≈ 57 ns. Además el tiempo de formación del excímero coincidió con el tiempo más corto de decaimiento del monómero, **tabla 2**.

Los espectros de fluorescencia resueltos en el tiempo de QD@Py (es decir registrados a distintos tiempos después del pulso del laser) **figura 16**, muestran que la emisión del monómero siempre está acompañada de una emisión a longitud de onda mayor; evidenciado la formación de un excímero con un tiempo de vida corto (emisión alrededor de los 450 nm), seguida por un excímero con un tiempo de vida más largo sobre los 475 nm. El desplazamiento de la emisión del excímero del

pireno es atribuido al solapamiento del dimero o a la propia formación del excímero⁴⁵.

Tabla 2. Resumen tiempos de vida de la fluorescencia del sistema QD@Py- en tolueno, N₂.

Parámetro	λ , emisión (nm)	τ_1 (ns)	A ₁	τ_2 (ns)	A ₂	
QD@Py	Monómero	390	108,0	32,0	10,0	68,0
	Excímero	475	57,0	100	12,8	-100
Ligando Py-L₁-SH		390	155,0	100	N.A	N.A

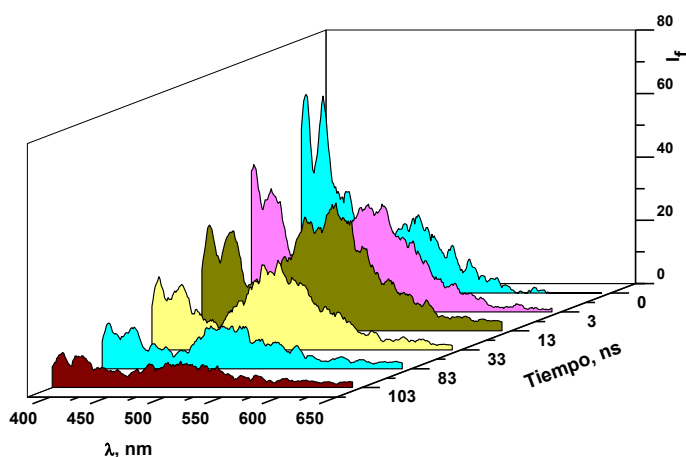


Figura 16. Espectros de fluorescencia resueltos en el tiempo de QD@Py en tolueno, N₂.

⁴⁵ (a) Todesco, R. V.; Basheer, R. A.; Kamat, P. V., Photophysical and photochemical behavior of poly (1-vinylpyrene). Evidence for dual excimer fluorescence. *Macromolecules* **1986**, *19* (9), 2390-2397; (b) Matsui, J.; Mitsuishi, M.; Miyashita, T., A study on fluorescence behavior of pyrene at the interface of polymer Langmuir-Blodgett films. *The Journal of Physical Chemistry B* **2002**, *106* (10), 2468-2473.

3. RESUMEN DE ARTÍCULOS PUBLICADOS RELACIONADOS CON LA TESIS

Con el fin de analizar la posible aplicación del QD@Py como sensor, se investigó los cambios o modificaciones de la fluorescencia del pireno con la adición de diferentes cantidades de nitrocompuestos aromáticos a dispersiones de QD@Py en tolueno. Se utilizaron los siguientes analitos: las nitroanilinas [3-nitroanilina (3-NA) y 4-nitroanilina (4-NA)] y nitrobencenos [nitrobenceno (NB), 4-nitrotolueno (4-NT), 2,4-dinitrotolueno (2,4-DNT), 2,6-dinitrotolueno (2,6-DNT)], **figura 17**.

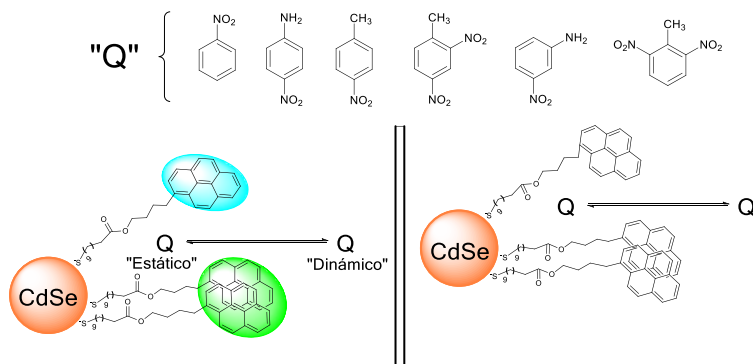


Figura 17. Arriba: estructuras de los nitrocompuestos utilizados en el estudio (Q), abajo: representación esquemática de la interacción de las especies emisoras de pireno del nanohíbrido CdSe@Py con los desactivadores.

Previamente, se realizaron ensayos control estudiando el efecto de los analitos sobre las propiedades fluorescentes de Py-L₁-SH. La ecuación de *Stern-Volmer* fue utilizada para cuantificar la eficiencia de desactivación de la fluorescencia. Los analitos mostraron una dependencia lineal de la relación I_0/I con concentraciones crecientes de los analitos según el siguiente

orden $NB < 4\text{-NT} < 2,4\text{-DNT} < 3\text{-NA} < 2,6\text{-DNT} \ll 4\text{-NA}$, **figura 18**. Adicionalmente, los estudios de fluorescencia resueltos en el tiempo confirman que el mecanismo es principalmente dinámico, incluso en el caso de 4-NA.

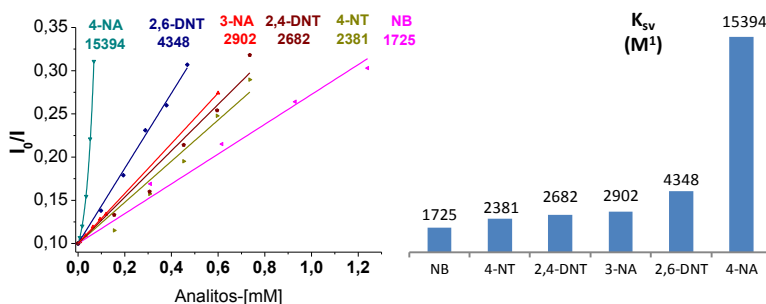


Figura 18. Gráficos de *Stern-Volmer* de Py-L₁-SH en presencia de distintos analitos: Izquierda- ajustes de la ecuación típica. Derecha- comparativo de las K_{sv} obtenidas.

A continuación se evaluó la desactivación de la fluorescencia de QD@Py en estado estacionario y resuelta en el tiempo. La adición de cantidades crecientes de nitrobenzono al sistema híbrido QD@Py disperso en tolueno, produce un aumento gradual de la absorción en la zona cercana a 288 nm, mientras que el cambio es despreciable a la longitud de onda de excitación $\lambda_{exc}=345$ nm, por lo tanto no fue necesario una corrección por el efecto de filtro interno, **figura 19**.

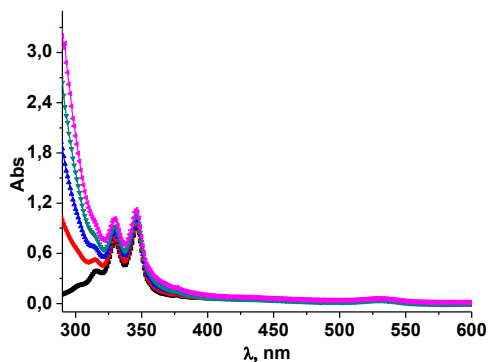


Figura 19. Espectros de absorción QD@Py con las cantidades crecientes de nitrobenzeno en tolueno, en atmósfera de N_2 .

La intensidad de la fluorescencia y el tiempo de vida tanto para el monómero como para el excímero del QD@Py varían linealmente con las concentraciones crecientes del analito **figura 20**, lo que indica que la desactivación es dinámica. Curiosamente, las constantes K_{sv} (**tabla 3**), son similares para el monómero y el excímero, lo que induce que la disminución de la señal del excímero en presencia del analito no refleja convenientemente la desactivación de monómero. Estos resultados demuestran la independencia de la emisión del excímero y del monómero en el sistema híbrido.

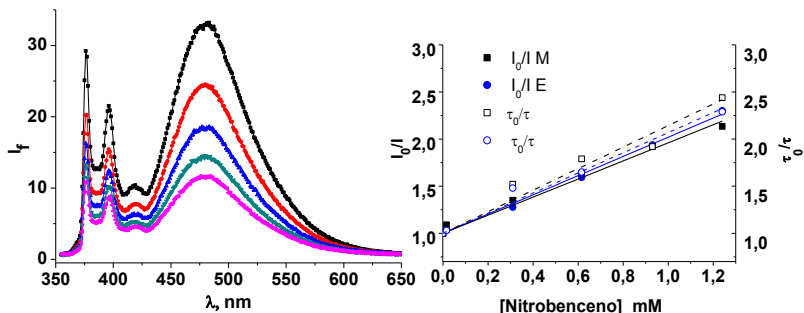


Figura 20. QD@Py ($1 \times 10^{-6} \text{M}$) en tolueno y atmosfera de N_2 , en presencia de cantidades crecientes de NB. **Izquierda:** espectro de emisi3n ($\lambda_{\text{exc}}=345 \text{ nm}$) **Derecha:** Graficas de *Stern-Volmer* (l3nea continua) y tiempo de vida (l3nea punteada) del mon3mero (negro, $\lambda_{\text{em}}=390 \text{ nm}$) y exc3mero (azul, $\lambda_{\text{em}}=475 \text{ nm}$).

Tabla 3. Resumen de las constantes de desactivaci3n de *Stern-Volmer* en estado estacionario y resueltas en el tiempo (K_{sv} y K_{d} , respectivamente), para la desactivaci3n de la fluorescencia del mon3mero y el exc3mero de QD@Py.

Analito	QD@Py ⁴⁶			
	Mon3mero		Exc3mero	
	$K_{\text{sv-M}}$ (M^{-1})	$K_{\text{d-M}}$ (M^{-1})	$K_{\text{sv-E}}$ (M^{-1})	$K_{\text{d-E}}$ (M^{-1})
3-nitroanilina	2516	1160	626	160
4-nitroanilina	21925	2482	18092	2483
nitrobenzeno	964	1142	1024	1067
4-nitrotolueno	1938	296	1286	883
2,4-dinitrotolueno	2029	20	1384	508
2,6-dinitrotolueno	2668	194	1697	918

⁴⁶ Correlaci3n lineal $r^2 > 0,993$, con excepci3n de K_{d} (mon3mero) en la 4-NT (0,922) y la K_{d} (exc3mero) en 2,6 DNT (0,985).

3. RESUMEN DE ARTÍCULOS PUBLICADOS RELACIONADOS CON LA TESIS

La eficiencia de desactivación del monómero fue $NB < 4-NT < 2,4-DNT < 3-NA < 2,6-DNT << 4-NA$, **figura 21**, similar al comportamiento que presenta el ligando. La secuencia para el excímero varía y sigue el siguiente orden $3-NA < NB < 4-NT < 2,4-DNT < 2,6-DNT << 4-NA$.

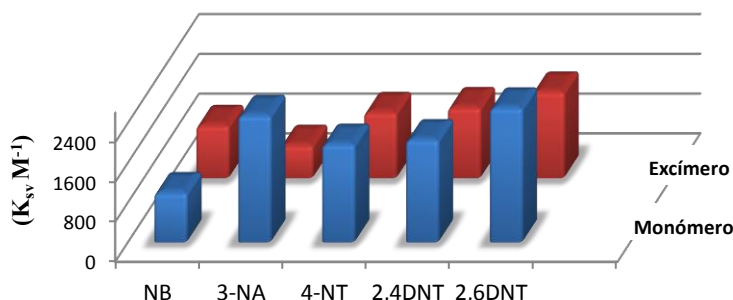


Figura 21. Comparación entre las constantes de desactivación K_{sv} de QD@Py monómero (●) y excímero (●)

En general, la dependencia de I_0/I con la concentración de analitos (K_{sv}) es considerablemente mayor que la relación τ_0/τ (K_d), (**tabla 3**), tanto para el monómero como para el excímero. Este hecho indica procesos de desactivación estática contribuyendo a la desviación de la fluorescencia de ambas especies. La contribución de la desactivación estática “*aparente*” podría reflejar la cercanía entre el fluoróforo y los analitos, por tanto la capacidad de QD@Py para encapsular los analitos en áreas cercanas al QD@Py con alta o baja concentración local de pireno.

Por lo tanto, estos hallazgos son compatibles con la coexistencia de una distribución no homogénea de pireno en la superficie de la NP y una diferente cantidad de unidades de pirenos sobre las NP, **figura 22**.

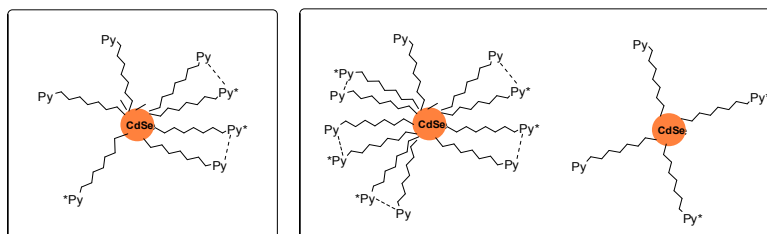


Figura 22. Distribución de pirenos sobre los QD.

Por consiguiente, la selectividad de este sistema híbrido puede ser analizado, utilizando la eficiencia de desactivación del monómero (K_{SV-M}) y del excímero (K_{SV-E}), así como utilizando las constantes dinámicas (K_{d-M} y K_{d-E}). Estos valores podrían ser utilizados de forma individual o conjunta para diferenciar entre compuestos isoméricos, tales como la 3-NA y 4-NA ó 2,4-DNT y 2,6-DNT, o para el reconocimiento selectivo de un compuesto en una serie. Es importante resaltar que el sistema híbrido QD@Py es estable en el tiempo, mostrando las mismas propiedades fluorescentes después de un año de su preparación.

3-1.3. Conclusiones

La alta relación superficie/volumen de las nanopartículas de CdSe ha sido utilizada para obtener una alta concentración local de unidades de pireno en la periferia de la nanopartícula, permitiendo la aparición de las especies emisivas correspondientes (monómero y excímero) a bajas concentraciones de pireno.

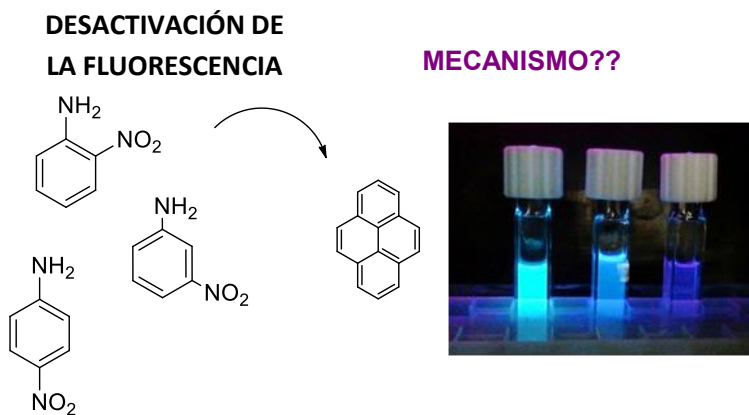
Las propiedades de detección del sistema funcionalizado nanopartícula@pireno se investigó mediante el uso de distintos compuestos nitroaromáticos [3-nitroanilina y 4-nitroanilina] y nitrobenenos [nitrobeneno, 4-nitrotolueno, 2,4-dinitrotolueno y 2,6-dinitrotolueno.

El sistema híbrido actúa como un sensor, fluorescente de dos canales independientes, en el que la desactivación de la emisión de fluorescencia del excímero, inducida por un desactivador, se ve poco afectada por la desactivación del monómero del pireno. La capacidad de encapsulación de las nanopartículas juega un papel muy importante en su sensibilidad al analito.



3-2. Nitroanilines as Quenchers of Pyrene

Carlos E. Agudelo-Morales, Oscar F. Silva, Raquel E. Galian,
and Julia Pérez-Prieto



ChemPhysChem, **2012**, 13 (18), 4195-4201

Copyright © 2012 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA,
Weinheim

“Desactivación de la Fluorescencia del Pireno por Nitroanilinas”

Las nitroanilinas son compuestos intermedios en la síntesis de colorantes, pesticidas, productos farmacéuticos así como los productos de la reducción de explosivos aromáticos. Han sido utilizados como desactivadores de fluorescencia de cromóforos orgánicos (benzo[k]fluoroanteno, antraceno) biomacromoléculas (albúmina de suero bovino), así como nanomateriales (nano-láminas de complejos de cobalto 8-hidroxiquinolina)⁴⁷. Algunos de estos sistemas fluorescentes han sido utilizados como sensores de aminas aromáticas isoméricas.^{37, 48}

Las nitroanilinas son moléculas altamente polares que contienen en el anillo aromático un grupo nitro y otro amino, aceptor y dador de electrones, respectivamente. El momento

⁴⁷ (a) Airinei, A.; Tigoianu, R. I.; Rusu, E.; Dorohoi, D. O., Fluorescence quenching of anthracene by nitroaromatic compounds. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* **2011**, *6* (3), 1265-1272; (b) Li, H.; Li, Y., Synthesis of highly luminescent cobalt(ii)-bis(8-hydroxyquinoline) nanosheets as isomeric aromatic amine probes. *Nanoscale* **2009**, *1* (1), 128-132; (c) Xiang, G.; Tong, C.; Haizhuan Lin, H.; Nitroaniline Isomers Interaction with Bovine Serum Albumin and Toxicological Implications., *Journal of Fluorescence*, **2007**, *17* (1), 512-521; (d) Seely, G. R.; Quenching of Pyrochlorophyll Fluorescence by Nitro Compounds. *The Journal of Physical Chemistry* **1969**, *73*, 125-129.

⁴⁸ Huang, H.-M.; Wang, K.-M.; Huang, S.-S.; Zhou, L.-J.; Li, D., Optical membrane for o-nitroaniline based on fluorescence energy transfer between a small molecule and a conjugated polymer. *Analytica chimica acta* **2003**, *481* (1), 109-117.

3. RESUMEN DE ARTÍCULOS PUBLICADOS RELACIONADOS CON LA TESIS

dipolar del estado fundamental, el potencial redox y la hiperpolarizabilidad se indican en la **tabla 1**.

Tabla 1. Momento dipolar (μ), potencial redox (E_{red}), e hiperpolarizabilidad (β) de las nitroanilinas⁴⁹.

Analito	μ (D)	E_{red} (V)*	β [10^{-30} esu]
2-M-4-NA	7,2941	--	42,0
4-NA	7,1753	-0,923	34.5
2-NA	4,7260	-0,882	10,0
3-NA	5,6762	-0,875	6,0
4-M-3-NA	5,2540	--	--
4-M-3,5-DNA	4,9910	--	--

* Voltagramas cíclicos, registrados con un electrodo de platino en solución de electrolito neutra⁵⁰.

La banda de absorción de menor energía de la 3-NA, 2-NA y la 4-NA (**figura 1**), se encuentran a ($\lambda_{\text{máx}}$ =348, 377 y 322 nm, respectivamente). Existen diferencias importantes en

⁴⁹ (a) Xiu-Fen, Y.; He-Ming, X.; Xue-Hai, J.; Xue-Dong, G., DFT Study on the QSAR of Nitroaromatic Compound Toxicity to the Fathead Minnow. *Chinese Journal of Chemistry* **2005**, *23* (8), 947-952; (b) Turchaninov, V. K.; Vokin, A. I.; Aksamentova, T. N.; Krivoruchka, I. G.; Shulunova, A. M.; Andriyankova, L. V., Solvatochromism of Heteroaromatic Compounds: XIX. Factors Affecting Quantitative Characteristics of Solvatochromism in Aprotic Inert Media. *Russian journal of general chemistry* **2003**, *73* (5), 743-752.

⁵⁰ Jbarah, A.; Holze, R., Comparative Spectroelectrochemical Study of the Redox Electrochemistry of Nitroanilines, *Journal of Solid State Electrochemistry* **2006**, *10* (1) 360–372.

relación a sus coeficientes de absorción molar (del orden de los 2200, 4800 y 12600 M⁻¹ cm⁻¹, respectivamente, en metilciclohexano⁵¹).

Se ha sugerido en estudios anteriores que la desactivación de la fluorescencia de los compuestos aromáticos por las nitroanilinas puede ser de naturaleza estática o dinámica y que se produce a través de transferencia electrónica o transferencia de energía.

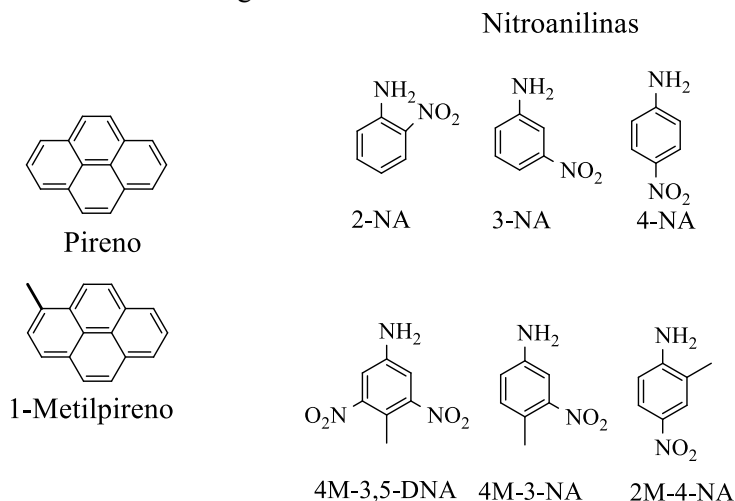


Figura 1. Estructura de los pirenos y las nitroanilinas evaluadas.

Además, se ha postulado la participación de un complejo fluoróforo*--NA (exciplejo), el cual se desactiva por transferencia electrónica, cruce intersistemas o conversión

3. RESUMEN DE ARTÍCULOS PUBLICADOS RELACIONADOS CON LA TESIS

interna⁵². En muchas ocasiones el comportamiento de la desactivación de nitrocompuestos tales como el 2-, 3- y 4-nitroanilina), ha sido comparado con el de explosivos nitrados, los cuales actúan como aceptores de electrones. Sin embargo, la eficiencia de desactivación de las nitroanilinas isoméricas no correlaciona adecuadamente con su potencial redox, el cual decrece en el orden 3-NA>2-NA>4-NA, **tabla 1**.⁵⁰

Nos planteamos que un estudio sistemático y detallado de la interacción entre un fluoróforo muy conocido y ampliamente utilizado como el pireno, permitiría profundizar en el papel o las rutas de desactivación de pirenos por las nitroanilinas. El interés del pireno como sonda fluorescente se debe a su: i) gran capacidad de absorción de luz. ii) largo tiempo de vida del singlete (>100 ns^{13,53} y iii) la importante información que puede ser obtenida de la relación (I_3/I_1) entre las bandas primera y tercera del espectro de emisión del monómero.⁵⁴

⁵² Reddy, A.; Thipperudrappa, J.; Biradar, D. S.; Lagare, M. T.; Hanagodimath, S. M., Fluorescence quenching of anthracene by aniline in different solvents. *Indian Journal of Pure & Applied Physics* **2004**, *42*, 648-652.

⁵³ Murov, S. L.; Carmichael, I.; Hug, G. L., *Handbook of photochemistry*. Second ed.; CRC Press: New York, 1993.

⁵⁴ (a) Kalyanasundaram, K.; Thomas, J. K., Environmental effects on vibronic band intensities in pyrene monomer fluorescence and their application in studies of micellar systems. *Journal of the American Chemical Society* **1977**, *99* (7), 2039-2044; (b) Deo, P.; Deo, N.; Somasundaran, P.; Jockusch, S.; Turro, N. J., Conformational Changes of Pyrene-Labeled Polyelectrolytes with pH: Effect of Hydrophobic Modifications. *The Journal of Physical Chemistry B* **2005**, *109* (44), 20714-20718.

En este capítulo se presenta la evaluación de la desactivación de fluorescencia del pireno y 1-metilpireno por nitroanilinas no sustituidas (2-, 3-, y 4-NA), metilnitroanilinas (4-metil-3-nitroanilina, 4-M-3-NA y 2-metil-4-nitroanilina, 2-M-4-NA) y una dinitroanilina (4-metil-3,5-dinitroanilina, 4-M-3,5-DNA) en tolueno y 1,4-dioxano, **figura 1**.

3-2.1. Estudios de absorción y fluorescencia en estado estacionario

Los espectros de absorción del pireno y el 1-metilpireno (con concentraciones de 31 y 37 μM , respectivamente) fueron comparados con el de cada una de las nitroanilinas (concentración de 40 μM) y sus mezclas pireno/NA en tolueno, **figuras 2-3**.

La superposición entre el espectro de absorción del pireno y cada nitroanilina es significativa en el caso de la 4-nitroanilina y la 2-M-4-NA, por lo que hay que tener en cuenta el efecto del filtro interno a la longitud de onda de excitación del pireno.

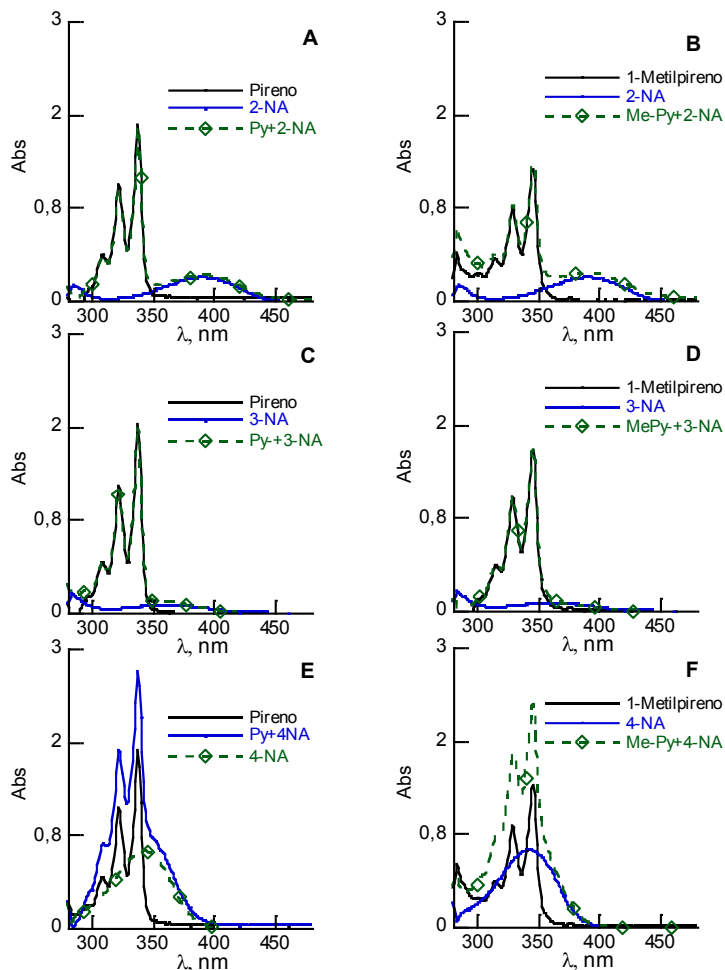


Figura 2. A-C-E) Espectro de absorción de pireno en tolueno (31 μM), espectro de la NA (40 μM) y el obtenido por la adición de la mezcla pireno/NA (31/40 μM). B-D-F) Espectro de absorción de 1-metilpireno en tolueno (37 μM), espectro de la NA (40 μM), y el obtenido por la adición de la mezcla 1-metilpireno/NA (37/40 μM).

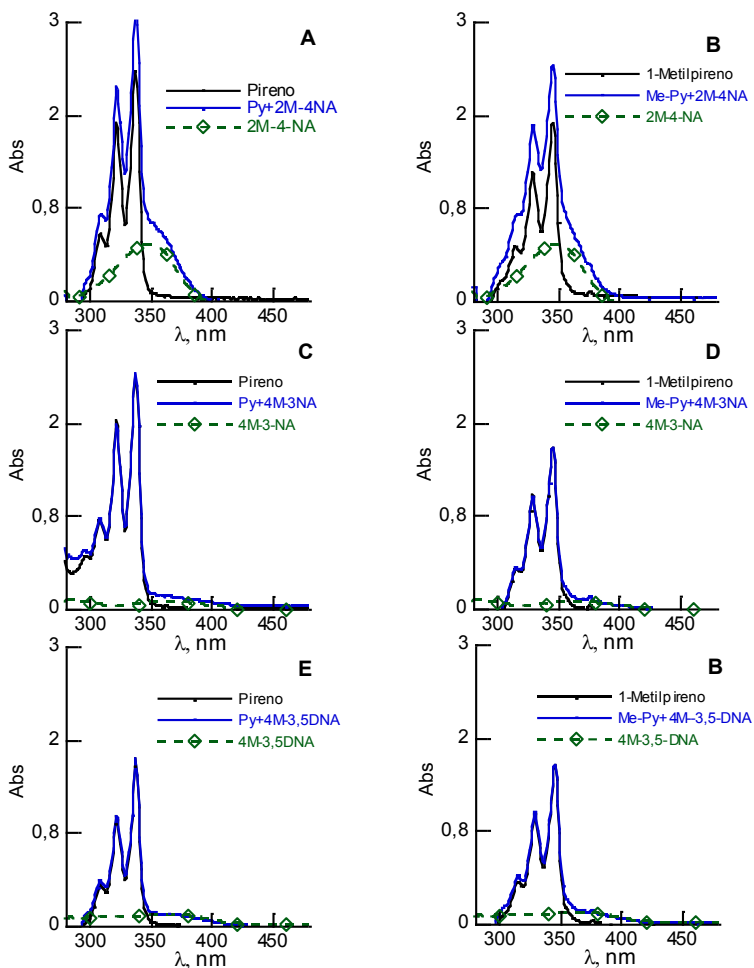


Figura 3. A-C-E) Espectro de absorción de pireno en tolueno (31 μM), espectro de la NA (40 μM) y el obtenido por la adición de la mezcla pireno/NA (31/40 μM). B-D-F) Espectro de absorción de 1-metilpireno en tolueno (37 μM), espectro de la NA (40 μM), y el obtenido por la adición de la mezcla 1-metilpireno/NA (37/40 μM).

3. RESUMEN DE ARTÍCULOS PUBLICADOS RELACIONADOS CON LA TESIS

Los estudios de fluorescencia en estado estacionario muestran que las nitroanilinas son fuertes desactivadores de la emisión de fluorescencia del pireno.

En la **figura 4** se muestran los espectros de emisión de pireno ($\lambda_{exc}=337$ nm) y 1-metilpireno ($\lambda_{exc}=345$ nm) en soluciones de tolueno en atmósfera de nitrógeno (31 μM para el pireno y 37 μM para el 1-metilpireno), en presencia de cantidades crecientes de de 2-, 3- y 4-NA hasta 40 μM . Considerando los valores de absorción de las nitroanilinas a la λ_{exc} se utilizó la **ecuación 1**, conocida como ecuación de corrección de efecto interno primario y secundario⁵⁵, para analizar la desactivación de la fluorescencia del pireno.

$$n_{ps} = \frac{A_{X_0} A_{Y_0} (1 - 10^{-A_{X_i}})(1 - 10^{-A_{Y_i}})}{A_{X_i} A_{Y_i} (1 - 10^{-A_{X_0}})(1 - 10^{-A_{Y_0}})}$$

Ecuación 1: Corrección de filtro interno para la excitación y la emisión.^{56, 56}

⁵⁵ Borissevitch, I. E., More about the inner filter effect: corrections of Stern–Volmer fluorescence quenching constants are necessary at very low optical absorption of the quencher. *Journal of Luminescence* **1999**, *81* (3), 219-224.

⁵⁶ n_{ps} : es el factor de corrección para la excitación y emisión. A_{x_0} y A_{x_i} : absorbancias del fluoróforo y del desactivador a la longitud de onda de excitación. A_{y_0} y A_{y_i} : Son las absorbancias del fluoróforo y el desactivador a la longitud de onda de emisión.

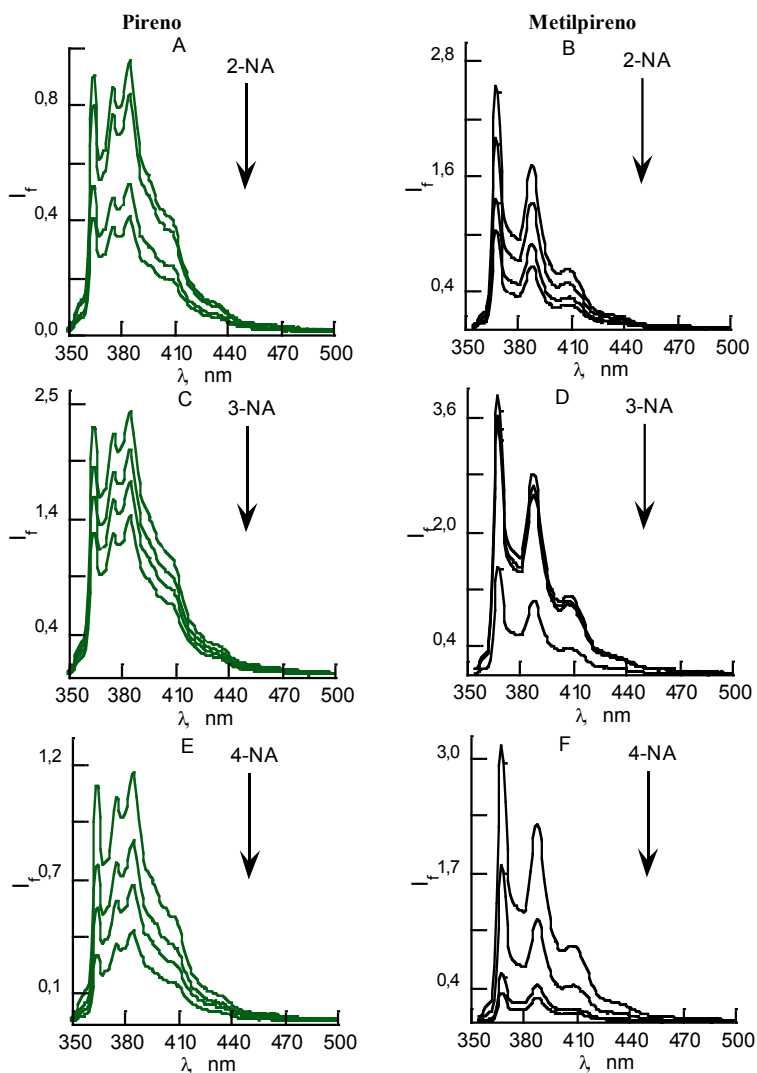


Figura 4. A-C-E) Espectro de emisión ($\lambda_{exc}=337$ nm) de pireno en soluciones de tolueno en atmósfera de N_2 ($31 \mu M$), en presencia de cantidades crecientes de NA (hasta $40 \mu M$). B-D-F) Espectro de emisión ($\lambda_{exc}=345$ nm) de metilpireno en soluciones de tolueno en atmósfera de N_2 ($37 \mu M$), en presencia de cantidades crecientes de NA (hasta $40 \mu M$).

El área bajo la curva del espectro de emisión del pireno fue registrado en ausencia “ I_0 ” y presencia “ I ” de cantidades crecientes de nitroanilinas, y se graficaron las relaciones I_0/I versus las concentraciones utilizadas de las nitroanilinas. La relación I_0/I muestra una tendencia lineal para 3-NA y una desviación positiva de la linealidad en 2-NA y 4-NA, (**figura 5. A y 5. C**).

La desactivación de la fluorescencia para la 2-M-4NA muestra una tendencia similar a la 4-NA, mientras que para 4-M-3-NA y 4-M-3,5-DNA se obtuvieron resultados análogos al 3-NA, (**figuras 5. A y 5. C**). Los ajustes de *Stern-Volmer* para el pireno y 1-metilpireno, se representan en las **figuras 5 y 6** para el tolueno y dioxano, respectivamente.

Es importante destacar que la 2-NA y 4-NA tienen una considerable absorción en la región del espectro de emisión del cromóforo, por lo que el espectro de emisión del pireno fue también registrado a una longitud de onda máxima fija (pireno $\lambda_{emi}=364$ nm y 1-metilpireno $\lambda_{emi}=368$ nm; en tolueno) en presencia de concentraciones crecientes de las nitroanilinas. Las intensidades de emisión fueron corregidas teniendo en cuenta la absorbancia del desactivador a la longitud de onda de excitación y en la de emisión⁵⁶. Los gráficos de la relación I_0/I versus concentración de desactivador (NAs) muestra una desviación positiva de la linealidad a concentraciones crecientes del desactivador.

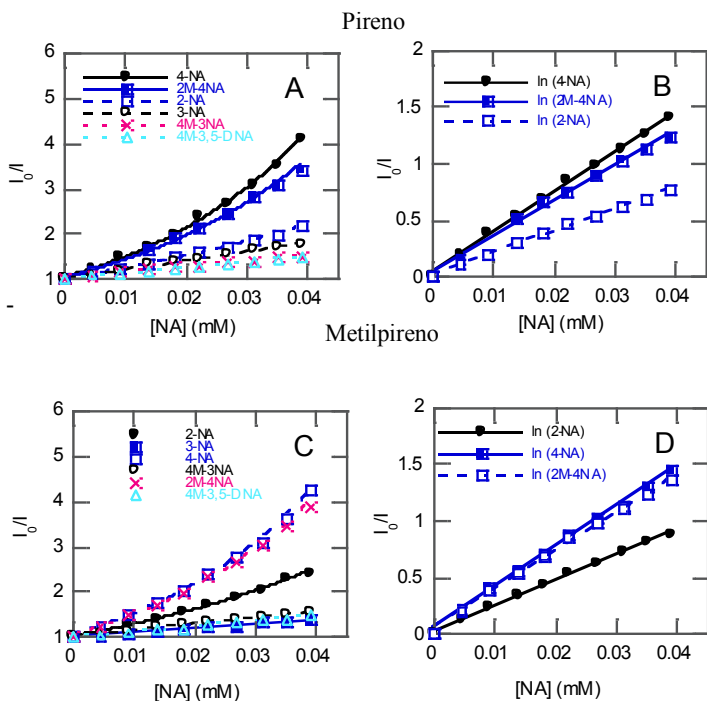


Figura 5. Ajustes de *Stern-Volmer* de la desactivación de la fluorescencia del pireno (A, $\lambda_{exc}=337$ nm) y metilpireno (C, $\lambda_{exc}=345$ nm) en soluciones de tolueno en atmósfera de N_2 a temperatura ambiente en presencia de cantidades crecientes de nitroanilinas NA. Los datos para la 2-, y 4-NA se ajustan al modelo de desactivación estática de Perrin (B: pireno; D: metilpireno). Las intensidades de emisión fueron corregidas por el efecto de filtro interno primario y secundario.

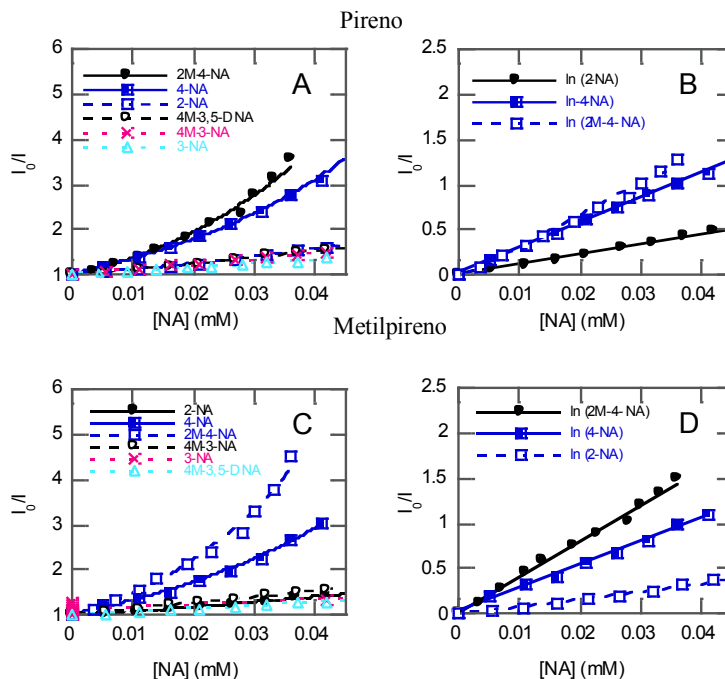


Figura 6. Ajustes de Stern-Volmer de la desactivación de la fluorescencia del pireno (A, $\lambda_{exc}=337$ nm) y metilpireno (C, $\lambda_{exc}=345$ nm) en soluciones de dioxano en atmósfera de N_2 a temperatura ambiente con cantidades crecientes de nitroanilinas NA. Los datos para la 2-, y 4-NA se ajustan al modelo de desactivación estática de Perrin (B: pireno; D: metilpireno). Las intensidades de emisión fueron corregidas por el efecto de filtro interno primario y secundario.

Los datos de I_0/I para las 3-nitroanilinas se ajustan adecuadamente a la ecuación lineal de *Stern-Volmer*, (**figuras 5** y **6** en tolueno y dioxano, respectivamente) evidenciando una desactivación de la fluorescencia predominantemente estática ó dinámica de la fluorescencia.

En este sentido, se debe tener en cuenta que en el caso de la desactivación estática la formación del complejo puede dar lugar a desviaciones positivas en los ajustes de la ecuación *de Stern-Volmer*. Por este motivo, los datos de desactivación de la fluorescencia del pireno por 2-, y 4-NA fueron analizados usando distintos modelos de desactivación exclusivamente estática y desactivación combinada “estática y dinámica”, sin embargo los datos no se ajustaron a estos modelos. Cabe destacar, que las curvas para la desactivación de la fluorescencia del pireno por la 2-, y 4-NAs se ajustaron adecuadamente al modelo modificado de desactivación estática de Perrin **ecuación 2**.

$$\ln\left(\frac{I_0}{I}\right) = K_{ap}[Q] \quad \text{Ecuación 2}$$

donde K_{ap} , es la constante de desactivación estática aparente en tolueno y dioxano (**figuras 5B-D y 6B-D** respectivamente). Este modelo de desactivación estática se produce entre los fluoróforos distribuidos al azar en la solución y el desactivador localizado en la proximidad al fluoróforo (espacio conocido como “esfera o volumen de acción”). Las moléculas del fluoróforo que están en contacto con el “Q” en el momento de la excitación no serán fluorescentes. En el mejor de los casos, estas moléculas pueden tener una mínima probabilidad de fluorescencia si la desactivación no es totalmente eficiente. Algunas de las moléculas de fluoróforo serán desactivadas de forma dinámica.

3. RESUMEN DE ARTÍCULOS PUBLICADOS RELACIONADOS CON LA TESIS

El análisis detallado de los espectros de emisión del pireno al incrementar la concentración de la NA hasta 40 μM evidenció que en algunos casos existen cambios en la relación de las bandas I_3/I_1 ($I_1=364$ nm y $I_3=384$ nm), (**figura 7**). Esta relación no cambia cuando se utilizan concentraciones crecientes de 3-NA, 4-M-3-NA, y 4-M-3,5-DNA, como desactivadores, pero disminuye ligeramente en el caso de la 2-NA, e incrementa significativamente en presencia de concentraciones crecientes de las 4-NA's (4-NA y 2-M-4-NA).

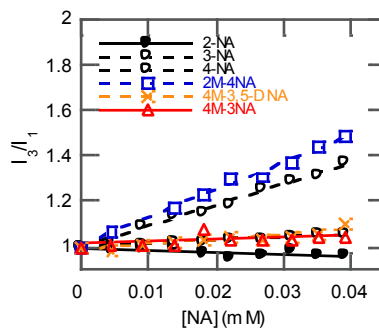


Figura 7. Cambio de la proporción I_3/I_1 de la emisión del pireno $\lambda_{exc}=337$ nm, en soluciones de tolueno en atmósfera de N_2 y en presencia de concentraciones crecientes de la NA correspondiente. Las intensidades de emisión fueron corregidas por la absorción del desactivador a la longitud de onda de excitación.

A continuación se analizó la emisión de muestras de 1-metilpireno/4-NA, normalizadas a 364 nm, donde la emisión de la fluorescencia presenta menor interferencia. El análisis del espectro de emisión diferencia entre 1-metilpireno y el de la mezcla 1-metilpireno/4-nitroanilina mostró una nueva banda de emisión que se extiende desde 375 nm a 450 nm y presenta un λ_{max} alrededor de 380 nm, (esto es, desplazado hacia el rojo respecto a la emisión del 1-metilpireno) **figura 8**. El resultado fue similar para el pireno. La **figura 8** muestra además el espectro de excitación diferencia entre el espectro de excitación del metilpireno y la mezcla metilpireno/4-NA (37 μ M/40 μ M), con amplia banda de absorción entre 250 y 340 nm y máximo alrededor de 320 nm, y debe asemejarse al espectro de absorción de la nueva especie emisiva.

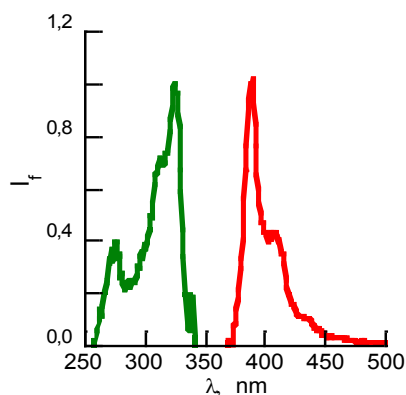


Figura 8. Espectros de emisión (rojo) y excitación (verde) diferencia para la mezcla de 1-metilpireno/4-NA (37 μ M/40 μ M) en dioxano y atmósfera de N₂. Espectro de excitación ($\lambda_{\text{em}}= 364$ nm), espectro de emisión ($\lambda_{\text{exc}}= 345$ nm).

Por lo tanto, el cambio en la relación I_3/I_1 de las bandas de emisión del pireno en presencia de 4-NA está relacionado con la formación de un complejo Py-NA en el estado fundamental. La excitación a 365 nm de este complejo daría lugar a la emisión mostrada en la **figura 8** y afectaría a la forma del espectro resultante.

Aunque el espectro de excitación evidencia la formación de un complejo en el estado fundamental Py--NA, principalmente en los casos de las 4-NAs, estas especies no fueron detectadas por espectroscopia de absorción. Esto indica que estas especies son generadas en muy bajas concentraciones y/o poseen un bajo coeficiente de absorción molar.

Por otra parte, la eficiencia de desactivación de las NAs es levemente influenciada por la naturaleza del disolvente (tolueno vs 1,4-dioxano) y/o la sustitución en el cromóforo (pireno vs 1-metilpireno), pero es considerablemente mayor para las 4-NA, **figura 9**.

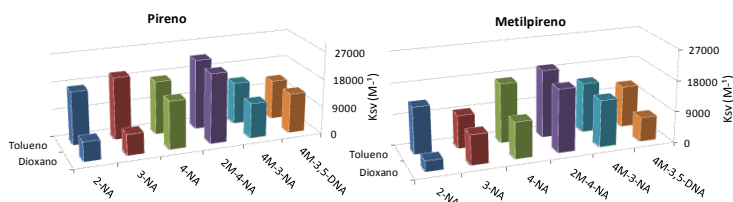


Figura 9. Comparación de las constantes de desactivación K_{SV} de la emisión del pireno (izquierda) y 1-metilpireno (derecha) en disoluciones de tolueno y dioxano para cada una de las NAs, las intensidades de emisión fueron corregidas teniendo en cuenta el efecto de filtro interno primario y secundario.

3-2.2. Estudios de fluorescencia resueltos en el tiempo.

Las medidas de fluorescencia resuelta en el tiempo fueron realizadas con el fin de determinar de una forma mucho más precisa la naturaleza dinámica y/o estática de la desactivación de fluorescencia del pireno por las NAs. Los datos se analizaron usando la **ecuación 3**.

$$\tau_0/\tau = 1 + K_d[Q] = 1 + k_q\tau_0[Q] \quad \text{Ecuación 3.}$$

Donde k_q es la constante de desactivación, τ y τ_0 son los tiempos de vida de la especie en estado excitado en presencia y ausencia, respectivamente, del desactivador Q. Estos estudios confirman que la desactivación de la fluorescencia del pireno por 3-NA y 4-M-3-NA es predominantemente dinámica, **figura 10-B**

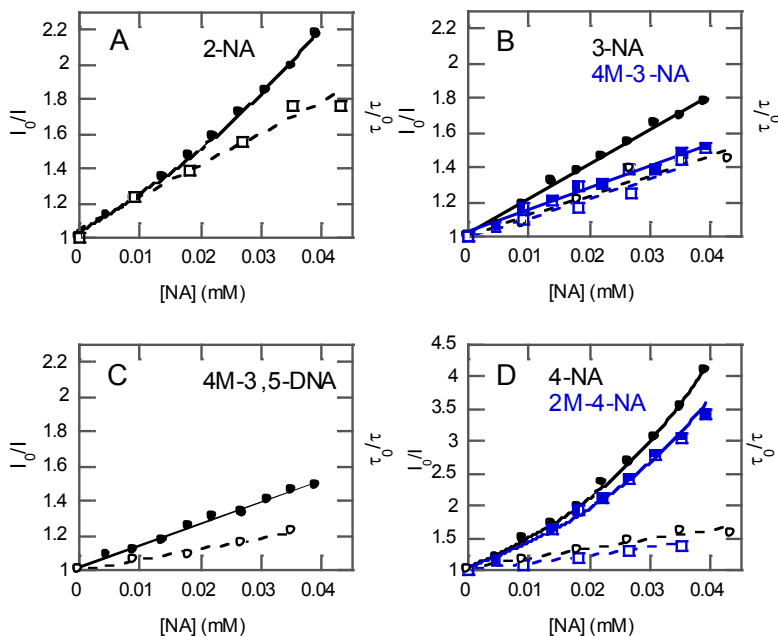


Figura 10. Ajustes de *Stern-Volmer* mostrando la comparación entre las intensidades de fluorescencia de pireno (I_0/I) su tiempo de vida (τ_0/τ , λ_{emi} a 364 nm) en soluciones de tolueno en atmósfera de N_2 dependientes de la concentración de la NA.

La desactivación de emisión del pireno por 2-NA también exhibe una importante contribución dinámica, **figura 10-A**. Por el contrario, existe una considerable contribución estática en el caso de 4-M-3,5 DNA, **figura 10-C**. Por último, la elevada contribución de la desactivación estática aparente fue confirmada para la 4-NA y la 2-M-4-NA, **figura 10-D**, donde se demuestra que la contribución dinámica es mucho menor, **tabla 2**.

Tabla 2. Constantes de *Stern-Volmer* (constante de asociación K_a , constante de desactivación estática aparente K_{ap}), de la desactivación de la fluorescencia del pireno y 1-metilpireno por las distintas nitroanilinas en tolueno y dioxano, obtenidas de los estudios en estado estacionario y la constante de velocidad de desactivación k_q resueltas en el tiempo.

Nitroanilina	Fluoróforo	Disolvente	(K_a or K_{ap}) [*] (M^{-1})	(k_q (10^9)) ($M^{-1}S^{-1}$)	
2-NA	Metilpireno	Dioxano	8196 ^c 3129*	17,1	
		Tolueno	23374 13554*	50,9	
	Pireno	Dioxano	11204 6383*	28,1	
		Tolueno	20150 17376*	134,9	
	3-NA	Metilpireno	Dioxano	8631	43,5
			Tolueno	9613	74,6
Pireno		Dioxano	6858	19,6	
		Tolueno	20306	122,7	
4-NA	Metilpireno	Dioxano	15343 10554*	13,10	
		Tolueno	19546 17222*	84,1	
	Pireno	Dioxano	18595 15637*	28,2	
		Tolueno	22825 17384*	94,4	
	2-M-4-NA	Metilpireno	Dioxano	26735 18262*	44,0
			Tolueno	25902 19678*	57,4
Pireno		Dioxano	22554 22729*	40,1	
		Tolueno	25776 22925*	64,7	
4-M-3-NA	Metilpireno	Dioxano	13541	31,5	
		Tolueno	14428	82,8	
	Pireno	Dioxano	11450	26,1	
		Tolueno	13729	53,6	
4-M-3,5-DNA	Metilpireno	Dioxano	7056	2,4	
		Tolueno	12042	53,5	
	Pireno	Dioxano	12944	--	
		Tolueno	12889	35,3	

*Correlación lineal $r^2 > 0,998$, con excepción para K_a en 2-NA (0,994). (Aplicado el factor de corrección).

3. RESUMEN DE ARTÍCULOS PUBLICADOS RELACIONADOS CON LA TESIS

Las constantes de desactivación obtenidas en estudios de fluorescencia resuelta en el tiempo muestran una importante dependencia de la naturaleza del disolvente **figura 11**. El tolueno y el 1,4-dioxano tienen un momento dipolar similar (0,31 y 0,45 Debye, respectivamente) pero difieren significativamente en su viscosidad (0,5 y 1,1 cP, respectivamente)⁵⁷. Por lo tanto, la disminución en las constantes k_q en el disolvente dioxano más viscoso está relacionada con la naturaleza del proceso de desactivación, es decir, el proceso depende de la difusión de las moléculas.

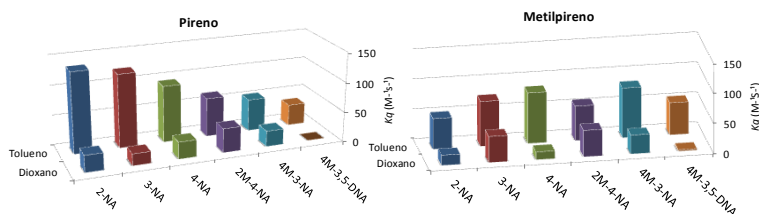


Figura 11. Comparación de las constantes de velocidad de desactivación de la emisión (k_q) del pireno (izquierda) y 1-metilpireno (derecha) en disoluciones de tolueno y dioxano por cada una de las NAs, obtenidas de los estudios de fluorescencia resuelta en el tiempo.

⁵⁷ Goyal, A.; Singh, M., Densities, viscosities and thermodynamic excess properties of ternary liquid mixtures of aniline and methyl alcohol as common components and non-polar solvents at 298.15 K. *Indian journal of chemistry. Section A, Inorganic, bio-inorganic, physical, theoretical & analytical chemistry* **2007**, 46 (1), 60.-69.

3-2.4. Conclusiones

La eficiencia de desactivación de fluorescencia del pireno por las NAs en disolventes con baja polaridad (tolueno y 1, 4-dioxano) se correlaciona mejor con el momento dipolar de las NAs, el cual decrece en el orden 2-M-4-NA>4-NA>>3-NA>4-M-3-NA>4-M-3,5-DNA>2-NA⁵⁰, o incluso su hiperpolarizabilidad (β), la cual decrece en el orden 4-NA>2-NA>3-NA⁵⁸, que con su potencial redox, el cual decrece en el orden 3-NA>2-NA>4NA .

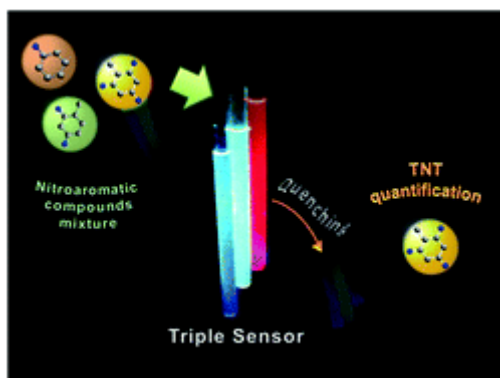
Estos cromóforos poseen una fuerte deslocalización electrónica π y transferencia de carga intramolecular por la presencia de los grupos dadores y aceptores de electrones en la molécula. Esto es particularmente relevante para las 4-NAs, cuya aparentemente desactivación estática de la fluorescencia del pireno es constante con su proximidad al fluoróforo en el estado fundamental.

Los datos muestran que las NAs establecen fuertes interacciones, con el pireno en su estado singlete, y en algunos casos en el estado fundamental.

⁵⁸ Nie, W., Optical Nonlinearity: Phenomena, applications, and materials. *Advanced Materials* **1993**, 5 (7-8), 520-545.

3-3. Three independent channel nanohybrids as fluorescent probes

Soranyel Gonzalez-Carrero, **Carlos Agudelo-Morales**, Miguel de la Guardia, Raquel E. Galian and Julia Pérez-Prieto



RSC Adv., **2015**,**5**, 90065-90070

Copyright © **2015**, Royal Society of Chemistry

“Nanohíbridos con Tres Canales Independientes como Sondas Fluorescentes”

A partir de los estudios previamente mencionados en el **capítulo 3-1**, nos planteamos utilizar nanopartículas semiconductoras del tipo core-shell CdSe/ZnS cubiertas del fluoróforo orgánico pireno, en las que la nanopartícula presente emisión a longitudes de onda mayor de 600 nm con el fin de aprovechar además las propiedades emisivas de las nanopartículas. De esta manera el nanohíbrido presentaría tres señales distintas emisiones del monómero, excímero y nanopartícula tras la excitación del nanosistema. La elección de la nanopartícula de tipo core-shell se debe a que sus propiedades luminiscentes son menos sensibles al anclaje de grupos tiol.

3-3.1. Caracterización de las nanopartículas de tipo core/shell de CdSe/ZnS

En este capítulo de la tesis, se utilizaron QDs comerciales de tipo core/shell de CdSe/ZnS (CS), adquiridas a la empresa OCEAN NanoTech, estabilizadas con octadecilamina como ligando. Estas nanopartículas presentan un máximo de absorción del excitón en 622 nm y de emisión en 640 nm, **figura 1**. El QD presenta un rendimiento cuántico de

emisión del 38%, determinado mediante el uso de Rodamina-101 como fluoróforo de referencia⁵⁹.

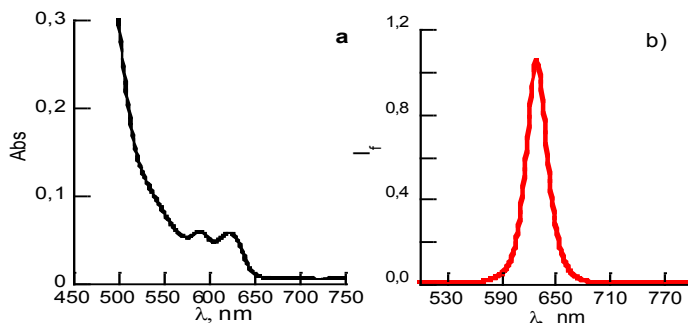


Figura 1. Espectro de absorción (●) y de emisión (●) de las nanopartículas de CdSe/ZnS en tetrahidrofurano (λ_{exc} = 340 nm).

El diámetro del core de las nanopartículas de CdSe/ZnS fue determinado a partir de la longitud de onda del pico del excitón; el tamaño promedio (diámetro, nm) del core, el coeficiente de extinción molar ($M^{-1} cm^{-1}$) y la concentración de la nanopartícula se muestran en la **tabla 1**. Como se menciona en el **capítulo 3-1**, para estos cálculos se utilizan ecuaciones reportadas por Peng y colaboradores⁴².

⁵⁹ Grabolle, M.; Spieles, M.; Lesnyak, V.; Gaponik, N.; Eychmüller, A.; Resch-Genger, U., Determination of the Fluorescence Quantum Yield of Quantum Dots: Suitable Procedures and Achievable Uncertainties. *Analytical Chemistry* **2009**, *81* (15), 6285-6294.

Tabla 1. Resumen de las propiedades del CdSe/ZnS (CS) y CS@Py

Np	λ_{abs} (nm)	[CS]	D (nm)	ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$)	λ_{emi} (nm)	Φ_f %	FWHM (nm)
CS	622	$8,4 \times 10^{-8}$	$5,8^{60}$	614000	640	37,7	30
CS@Py			$8,8 \pm 1,6^{61}$			21,0	

El tamaño del CS se corroboró por microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM), **figura 2**. Las nanopartículas presentan un diámetro de $8,8 \pm 1,6$ nm **tabla 1**. A partir de la diferencia entre el diámetro obtenido por microscopía electrónica y el diámetro por el espectro de absorción, se estima que el espesor del shell de ZnS es de 3,0 nm.

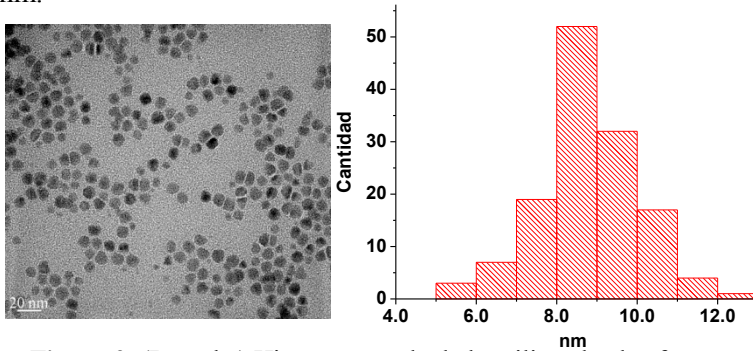


Figura 2. (Derecha) Histograma calculado utilizando el software Image J. (Izquierda) Imagen del CS@Py obtenida por microscopía electrónica de alta resolución, escala 20 nm.

⁶⁰ Corresponde al diámetro del core, estimado por el pico del excitón.

⁶¹ Calculado por HRTEM.

Intercambio de ligandos

El ligando utilizado ha sido mencionado previamente en el **capítulo 3-1.1** de esta tesis⁶². El intercambio del ligando se llevó a cabo por el método desarrollado en el grupo de investigación; mezclando una dispersión de las nanopartículas de CdSe/ZnS con el ligando Py-L₁-SH en cloroformo a reflujo durante 48 horas, en ausencia de luz y atmósfera de N₂, (**figura 3**), la relación molar utilizada fue de Py-L₁SH/QD= 5000/1.

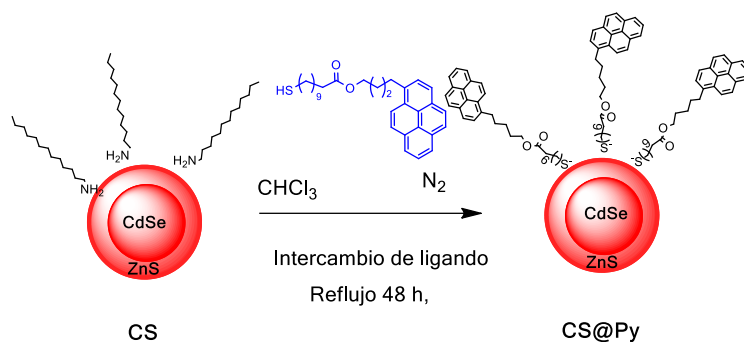
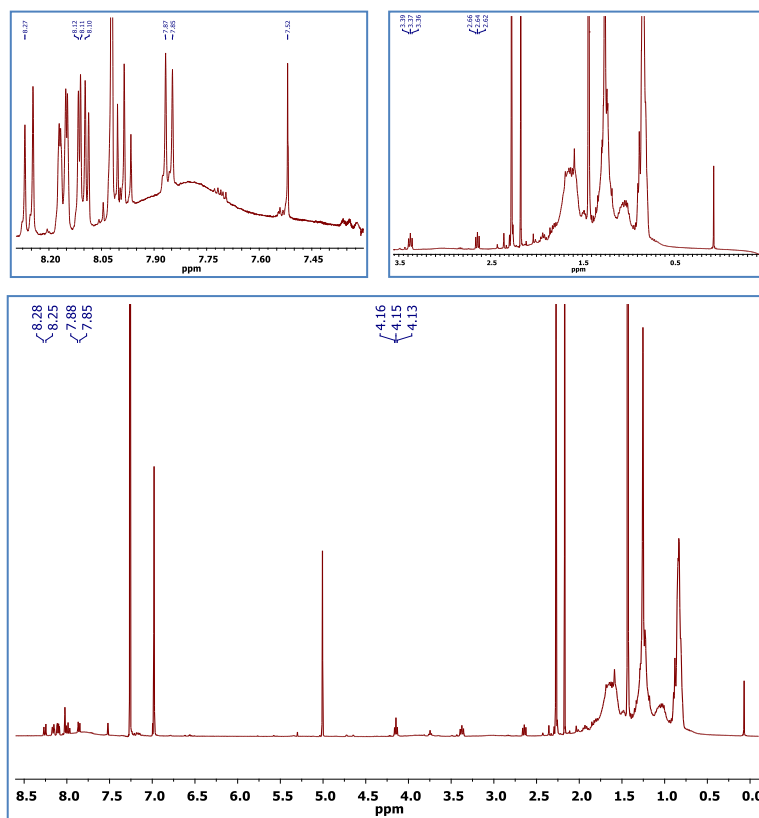


Figura 3. Esquema de la funcionalización del ligando Py-L₁-SH con la nanopartícula core/shell de CdSe/ZnS.

Posteriormente, las nanopartículas se precipitaron en metanol frío y se centrifugaron, repitiéndose este proceso cinco veces, garantizando finalmente en los últimos lavados la ausencia del ligando libre midiendo los espectros de absorción del sobrenadante. La incorporación del ligando al QD fue detectada por ¹H-RMN y espectroscopia de absorción (**figuras 4 y 5**, respectivamente). En el espectro de ¹H-RMN del CS@Py se

⁶² 11-mercaptoundecanoato de 4-(pirenil-1-il) butilo (Py-L₁-SH).

observa un ensanchamiento muy pronunciado de las señales entre 0,8 y 2 ppm, que corresponden a la cadena alquílica y alrededor de 8 ppm correspondientes al anillo aromático del pireno. Además, se observa un leve desplazamiento de las señales en relación con las del ligando libre. Estos datos son consistentes con la unión del ligando a la superficie de la nanopartícula.



114

Figura 4. Espectro de ^1H -RMN de la nanopartícula CdSe/Zn funcionalizada con el ligando Py-L₁-SH - (CS@Py).

El espectro de absorción de CS@Py en THF (**figura 5**), muestra las bandas típicas del pireno, entre 300 y 350 nm, y un pequeño pico a 622 nm correspondiente al excitón de la nanopartícula. El número de unidades del cromóforo pireno en cada nanopartícula fue estimado en 200 unidades de Pireno.

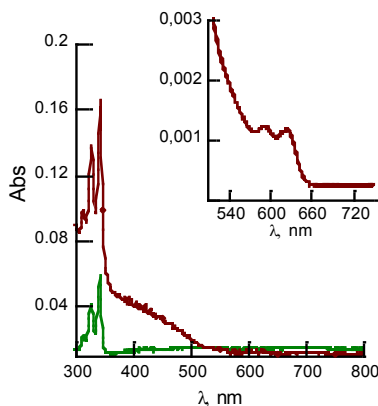


Figura 5. Espectro de absorción de CS@Py (●) y Py-L₁-SH (●) en tetrahidrofurano. Inserción: ampliación del espectro de absorción de CS@Py

Las imágenes de microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTM), **figura 6**, corroboran que el tamaño de la nanopartícula no cambia en el proceso de intercambio del ligando y concuerda con la estimación realizada por espectrofotometría ultravioleta-visible.

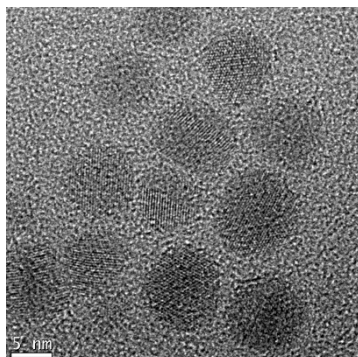


Figura 6. Imagen de las nanopartículas híbridas CS@Py obtenida por HRTEM, escala 5 nm.

3-3.2. Estudios fotofísicos de la nanopartícula funcionalizada

Se tomaron espectros de emisión a dos longitudes de onda de excitación distintas 340 y 450 nm. A $\lambda_{exc}=450$ nm absorbe selectivamente la nanopartícula y a $\lambda_{exc}=340$ nm absorben ambos cromóforos pireno y nanopartícula.

Comparando los espectros de emisión del CS de partida y el CS@Py (**figura 7**), se aprecia que el rendimiento cuántico de la nanopartícula disminuye un 49 %. Esta disminución se atribuye a una perturbación de la superficie de la nanopartícula y no a procesos de transferencia del hueco (h^+) del core al grupo

3. RESUMEN DE ARTÍCULOS PUBLICADOS RELACIONADOS CON LA TESIS

tiol anclante los cuales se producen cuando la nanopartícula carece del shell de ZnS (nanopartículas de CdSe)⁶³.

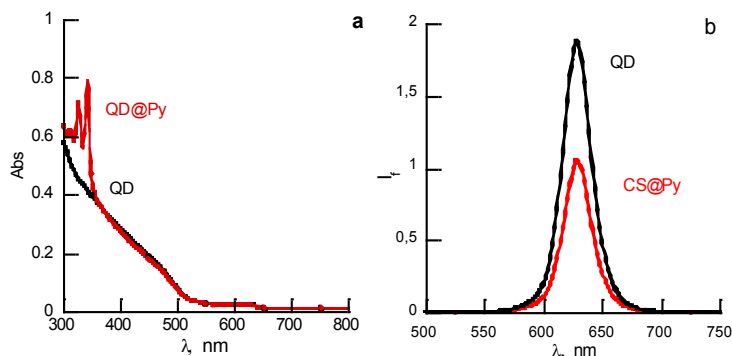


Figura 7. a) Espectros de absorción y b) espectros de emisión $\lambda_{exc}=450$ nm, de CS, ($\Phi=37,7\%$, ●) y el CS@Py (●), en tetrahidrofurano y atmósfera de N_2 .

Excitando a $\lambda_{exc}=340$ nm, el espectro de emisión de fluorescencia de CS@Py muestra las bandas correspondientes al monómero del pireno (370 nm -397 nm), el excímero del pireno (480 nm) y la emisión de fluorescencia del CS a 640 nm.

A diferencia del ligando libre, el sistema CS@Py presenta no solo la banda de emisión del monómero (M), sino la banda de emisión del excímero (E) del pireno (**figura 8**). Esta es una evidencia de la elevada concentración local de pireno en

⁶³ Aguilera-Sigalat, J.; Rocton, S.; Sanchez-Royo, J. F.; Galian, R. E.; Perez-Prieto, J., Highly fluorescent and photostable organic- and water-soluble CdSe/ZnS core-shell quantum dots capped with thiols. *RSC Advances* **2012**, 2 (4), 1632-1638.

la superficie de la nanopartícula. Hay que tener en cuenta que la contribución del pireno es del orden micromolar (10^{-6}) y el ligando libre en estas concentraciones no presenta la emisión del excímero.

Los espectros de emisión de Py-L₁-SH únicamente presenta la emisión del monómero, mientras en el sistema híbrido apreciamos las tres señales emisivas del sistema a una concentración nanomolar.

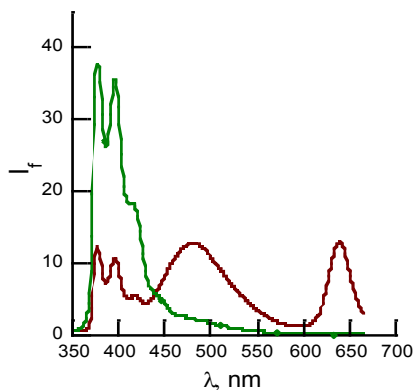


Figura 8. Espectro de fluorescencia ($\lambda_{exc}=340$ nm) del Py-L₁-SH (●), (1 μ M) y de CS@Py (●) (5nM) en THF.

3-3.3. Estudios de fluorescencia resueltos en el tiempo de la nanopartícula funcionalizada

Se analizan las especies emisivas del CS@Py, registrando las cinéticas de decaimiento de la fluorescencia a la longitud de onda de emisión de cada una de las señales:

3. RESUMEN DE ARTÍCULOS PUBLICADOS RELACIONADOS CON LA TESIS

monómero, excímero y nanopartícula. Se encontró que la cinética de decaimiento de la fluorescencia del monómero del CS@Py (**figura 9, izquierda**) presenta dos componentes (uno de tiempo de vida de 15,9 ns y otro con un tiempo de vida de 87,4 ns). El tiempo de formación del excímero de 17,3 ns (**figura 9, derecha** coincide con el tiempo más corto de desactivación del monómero, fenómeno previamente observado en las NPs de CdSe@Py. Los resultados se muestran en la **tabla 2**.

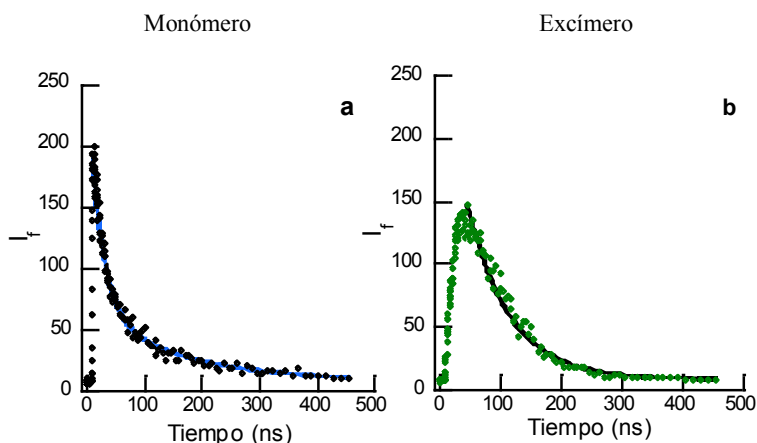


Figura 9. Cinéticas de decaimiento de la fluorescencia de CS@Py ($\lambda_{\text{exc}}= 337$ nm) en tetrahidrofurano y atmósfera de N_2 **a)** monómero del pireno a $\lambda_{\text{emi}} 397$ **b)** excímero del pireno a $\lambda_{\text{emi}} 480$ nm.

La emisión de la NP de CdSe/ZnS tiene un tiempo de vida de fluorescencia promedio de 35 ns y su cinética se ajusta a una ecuación biexponencial, **figura 10 y tabla 2**.

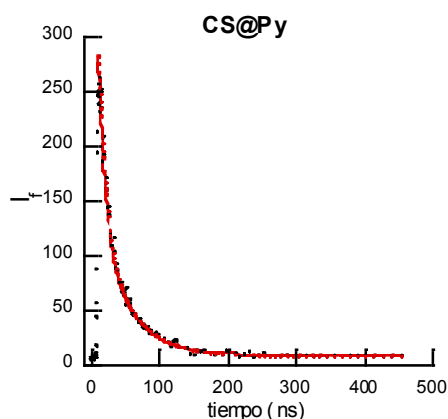


Figura 10. Cinética de decaimiento del CS@Py ($\lambda_{exc} = 337$ nm) en tetrahidrofurano y atmósfera N₂, λ_{emi} 640 nm.

Tabla 2. Datos de los estudios de la fluorescencia resuelta en el tiempo para el Py-L₁-SH, CS, y CS@Py, en tetrahidrofurano y atmósfera de N₂.

Parámetro	λ , emisión (nm)	τ_1 (ns)	A ₁	τ_2 (ns)	A ₂	τ (ns)*
Monómero	397	87,4	35,9	15,9	64,0	N.A
CS@Py	Excímero	480	53,3	17,3	-100	N.A
	Nanopartícula	640	43,1	45,5	11,8	54,5
Py-L ₁ -SH	397	94,7	100	--	--	--
CS. (CdSe/ZnS)	640	45,5	53,3	16,0	46,7	38,4

*Tiempo de vida promedio.

Los espectros de fluorescencia resueltos en el tiempo de CS@Py, tomados a diferentes escalas de tiempo después del pulso del láser (**figura 11**), muestran la emisión predominante del monómero y de la nanopartícula a los 10 ns, mientras que a los 35 ns predomina la emisión del excímero.

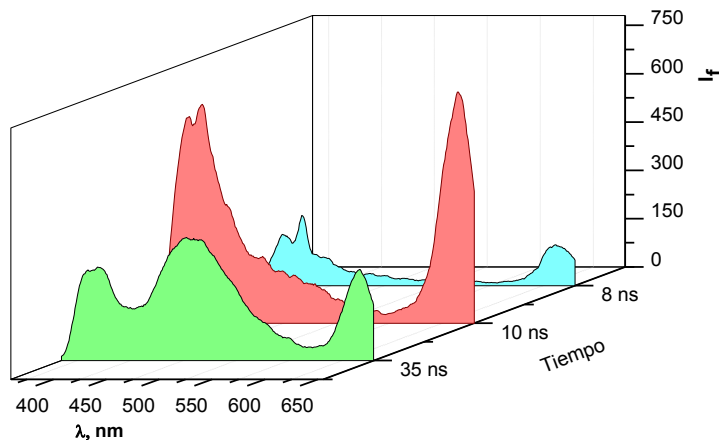


Figura 11. Espectros de fluorescencia resueltos en el tiempo de CS@Py en tetrahidrofurano y atmósfera de N₂ obtenidos tras el pulso del laser a 337 nm.

3-3.4. Estudios de desactivación de la fluorescencia del sistema CS@Py por nitrocompuestos aromáticos.

La fluorescencia en tres canales del CS@Py fue utilizada para el reconocimiento molecular de diferentes nitrocompuestos aromáticos, NAC (**figura 12**).

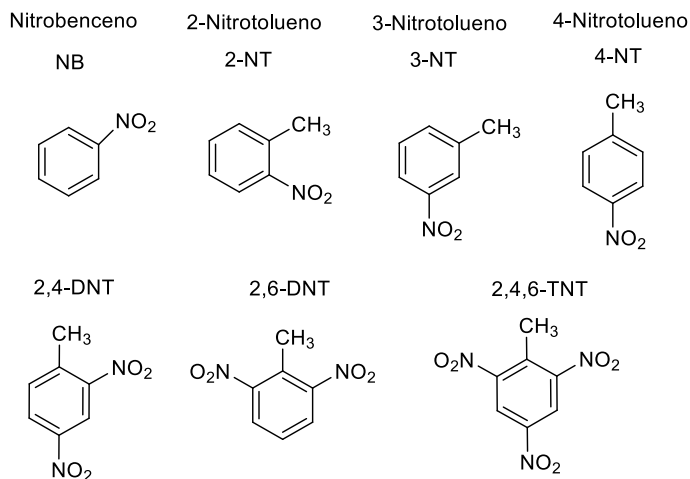


Figura 12. Estructuras de los nitrocompuestos aromáticos utilizados.

Todos los nitrocompuestos fueron adquiridos comercialmente, con la excepción del 2,4,6-trinitrotolueno, el cual se sintetizó mediante el proceso de nitración del 2,4-dinitrotolueno (2,4-DNT) descrita por Dennis y colaboradores⁶⁴.

Los estudios se realizaron a una concentración de 5 nM de CS@Py, en atmósfera de N₂. A esta solución se adicionaron cantidades crecientes de los nitrocompuestos en un rango de concentración entre 0-0,25 mM. Los cambios de la intensidad de fluorescencia I_0/I fueron corregidos por los efectos de filtro

⁶⁴ (a) Dennis, W. H.; Rosenblatt, D. H.; Blucher, W. G.; Coon, C. L., Improved synthesis of TNT isomers. *Journal of Chemical & Engineering Data* **1975**, *20* (2), 202-203; (b) Dorey, R. C.; Carper, W. R., Synthesis and high-resolution mass-spectral analysis of isotopically labeled 2,4,6-trinitrotoluene. *Journal of Chemical & Engineering Data* **1984**, *29* (1), 93-97.

interno primario y secundario (**Capítulo 3-2. Ecuación 1**)⁵⁶, causado por las absorbancia de los nitrocompuestos (**figura 13**).

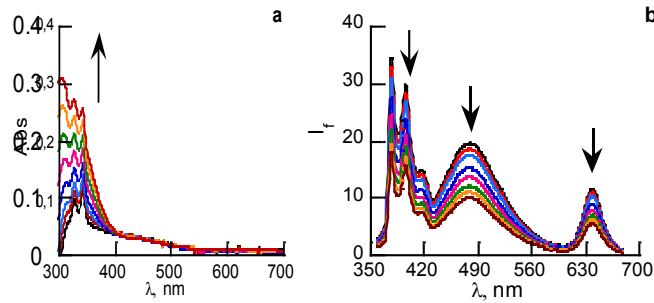


Figura 13. Espectros de absorción y emisión de CS@Py en presencia de concentraciones crecientes de TNT.

Las medidas de fluorescencia en estado estacionario y resueltas en el tiempo para las tres señales (M, E, CS) indican dependencia prácticamente lineal de las relaciones I_0/I y τ_0/τ con las concentración creciente de los analitos **figuras 14 y 15**.

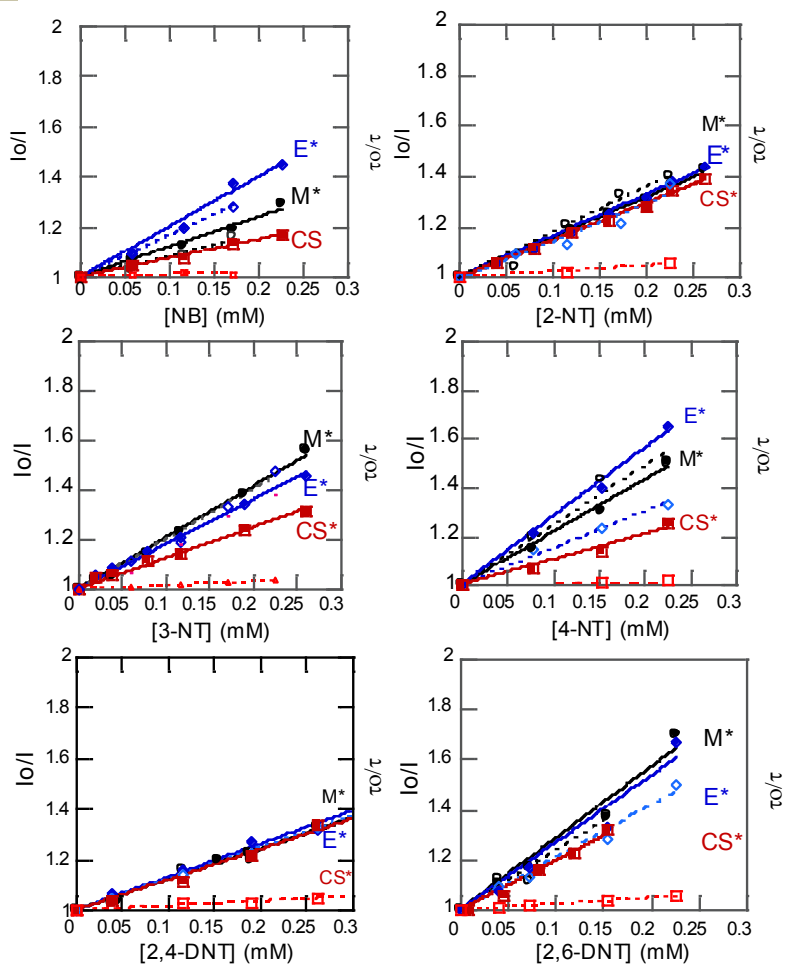


Figura 14. Ajustes de tipo *Stern-Volmer* que muestran la desactivación de la emisión (línea continua) y tiempo de vida (línea punteada) de fluorescencia de los CS@Py comparado con concentración de analitos. (●), monómero; (◆), excímero; (■), CS).

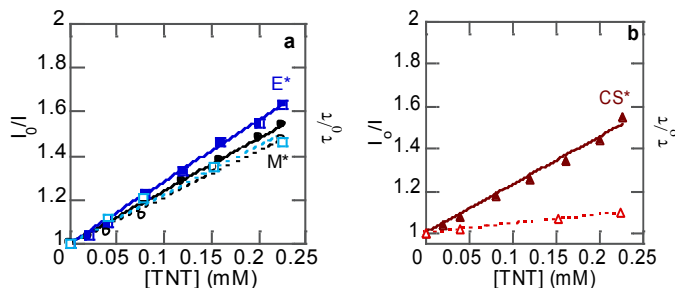


Figura 15. Ajustes de tipo *Stern-Volmer* que muestran la dependencia de la intensidad (línea continua) y el tiempo de vida de emisión (línea punteada) de CS@Py con la concentración de TNT.

Las constantes de desactivación (K_{sv} y K_d) de *Stern-Volmer* para las especies emisivas del pireno son similares indicando un mecanismo de desactivación predominantemente dinámico. Sin embargo, la K_d para la nanopartícula es muy pequeña, lo que indica que la desactivación de la fluorescencia de la nanopartícula es predominantemente estático. Estos datos son consistentes con la encapsulación de los NAC en la capa orgánica del nanohíbrido y por lo tanto cerca de la superficie del CS.

En el caso de la desactivación por nitrobenzeno, se observa que la desactivación del excímero (E) es mayor a la del monómero (M), lo cual reflejaría, en principio, la desactivación del monómero más la del propio excímero. Sin embargo, el hecho que la K_{sv} es similar a K_d descarta que la desactivación del excímero refleje la desactivación del monómero. Por lo tanto, se considera que ambas especies (monómero y excímero)

son canales independientes, **figura 14**. Las diferentes constantes de desactivación dinámica y estática de los tres canales se muestran en la **tabla 3**, evidenciando que cada señal varía dependiendo del analito estudiado.

Tabla 3. Constantes de desactivación de *Stern-Volmer*, K_{sv} y K_d , del monómero (M^*) y el excímero (E^*) y del estado excitado de la nanopartícula de (CS^*).

Analito	CS@Py ^a					
	M*		E*		CS*	
	$K_{sv} (M^{-1})$	$K_d (M^{-1})$	$K_{sv} (M^{-1})$	$K_d (M^{-1})$	$K_{sv} (M^{-1})$	$K_d (M^{-1})$
NB	1197	838	1994	1654	753	103
2-NT	1572	1781	1627	1440	1486	204
3-NT	2078	2014	1804	1676	1248	154
4-NT	2160	2431	2805	1509	1117	194
2,4-DNT	1220	1193	1306	1243	1200	182
2,6-DNT	2848	2374	2672	2090	1931	244
TNT	2372	2094	2786	2215	2267	456

^a Correlación lineal $r^2 > 0,980$.

La sensibilidad de cada canal hacia las NAC se analizó utilizando las constantes dinámicas de *Stern-Volmer*. Los valores para el canal del monómero (**figura 16**) disminuyen en el orden: 2,6 DNT > TNT > 4NT ~ 3NT > 2NT > 2,4DNT ~ NB.

3. RESUMEN DE ARTÍCULOS PUBLICADOS RELACIONADOS CON LA TESIS

Este análisis se realizó para los otros canales, encontrando que el orden de selectividad varía con el canal utilizado.

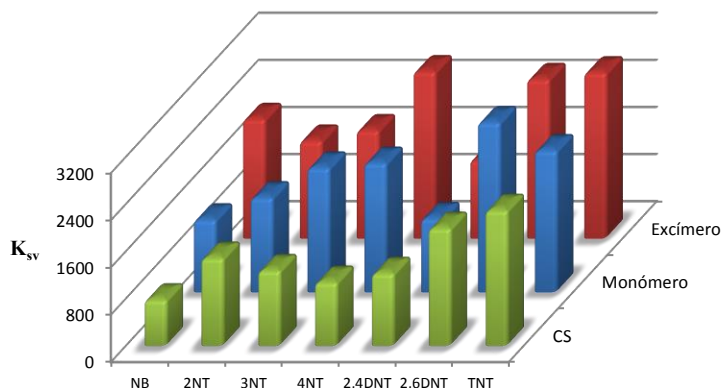


Figura 16. Comparación de las constantes de desactivación (K_{sv}) del monómero y excímero del pireno y el estado excitado del CS por los diferentes compuestos nitrocompuestos.

Además, se deduce que el 2,6-DNT y el TNT son los nitrocompuestos más eficaces para la desactivación de los tres canales (**figura 16**).

Con el propósito de evaluar la posibilidad de cuantificar trazas de los distintos nitrocompuestos, se calculó el límite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) utilizando los criterios de la IUPAC⁶⁵ basados en la sensibilidad y la desviación estándar de tres y diez medidas con el blanco para LOD y LOQ, respectivamente. El LOD es la concentración del analito (X_{b1})

⁶⁵ Shrivastava, A.; Gupta, V. B., Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chronicles of Young Scientists* **2011**, 2 (1), 21-25.

más tres veces la desviación estándar del blanco (σ_b) y LOQ es la concentración del analito (X_{b1}) en la muestra testigo más diez veces la desviación estándar del blanco (σ_b), (**ecuaciones 1 y 2**).

$$LOD = X_{b1} + 3\sigma_b \quad \text{Ecuación 1.}$$

$$LOQ = X_{b1} + 10\sigma_b \quad \text{Ecuación 2.}$$

Los límites de detección de los canales del CS@Py (**tabla 4**) obtenidos se encuentran por debajo de 0,13 ppm, mientras los límites de cuantificación se encuentran por debajo de 0,42 ppm. Por lo tanto, todos los NAC pueden ser cuantificados a nivel de trazas utilizando los canales del CS@Py.

Tabla 4. Límites de detección (LOD) y límites de cuantificación LOD, dados en ppm, para los diferentes nitrocompuestos aromáticos.

Nitrocompuesto	Monómero		Excímero		Nanopartícula	
	LOD ppm	LOQ ppm	LOD ppm	LOQ ppm	LOD ppm	LOQ ppm
NB	0,09	0,29	0,04	0,14	0,06	0,21
2-NT	0,07	0,24	0,06	0,19	0,03	0,12
3-NT	0,06	0,18	0,05	0,17	0,04	0,14
4-NT	0,05	0,18	0,03	0,11	0,05	0,15
2,4-DNT	0,13	0,42	0,10	0,32	0,06	0,19
2,6-DNT	0,05	0,18	0,05	0,16	0,04	0,12
TNT	0,08	0,27	0,06	0,19	0,04	0,13

3-3.5. *Cuantificación del TNT en mezclas binarias y ternarias de NAC*

La capacidad del CS@Py como sonda fluorescente con tres canales independientes fué evaluada cuantificando TNT en mezclas binarias y ternarias.

La aproximación de las ecuaciones proporcionales permitió obtener datos cuantitativos para mezclas de TNT, NB y 3-NT utilizando al menos el mismo número de ecuaciones independientes que analitos. La variación I_0/I depende de la concentración del NAC según la **ecuación 3**.

$$\frac{I_0}{I} = \sum K_{NAC} C_{NAC} \quad \text{Ecuación 3.}$$

Donde K_{NAC} , es la constante de desactivación estática de *Stern-Volmer* de cada nitrocompuesto y C_{NAC} , es la concentración del nitrocompuesto en la mezcla.

Para las mezclas binarias con relación 1:0,5 y 1:1 de TNT:NB los resultados de concentración de TNT mostraron errores menores a 3,3%, y 11,5%, respectivamente, en el canal del excímero, mientras que el error utilizando el canal del monómero fue inferior al 2,0 %, **figura 17**.

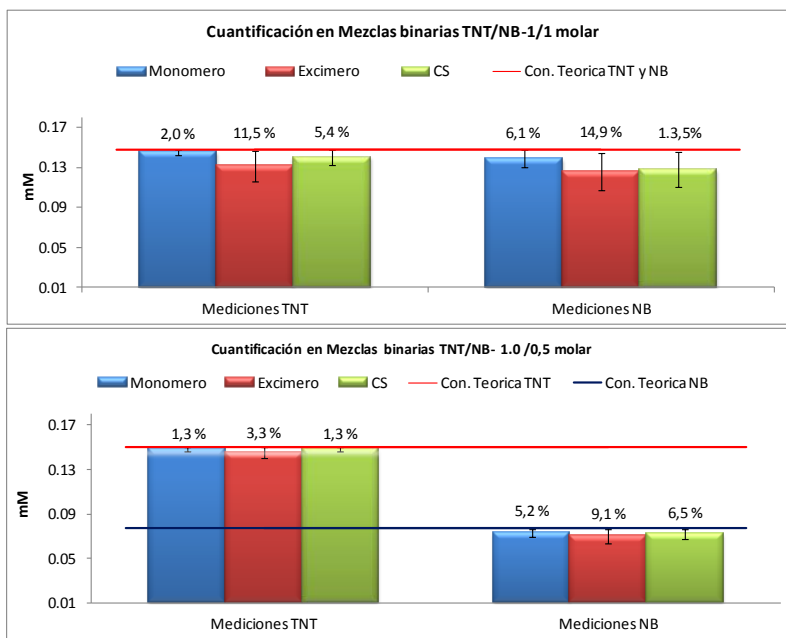


Figura 17. Cuantificación de TNT en mezclas binarias con el interferente nitrobenzeno con una relación molar TNT/NB 1:1 (arriba) y 1:0,5 (abajo).

Utilizando 3-NT como interferente en la mezcla binaria con relación 1:0,5 TNT:3NT los resultados de concentración de TNT mostraron errores menores al 20,7 %. En la relación 1:1 se encontraron errores menores a 24,3 % para la señal del monómero, 8,8 % para la señal del excímero y 6,8% en el canal de la nanopartícula, **figura 18.**

3. RESUMEN DE ARTÍCULOS PUBLICADOS RELACIONADOS CON LA TESIS

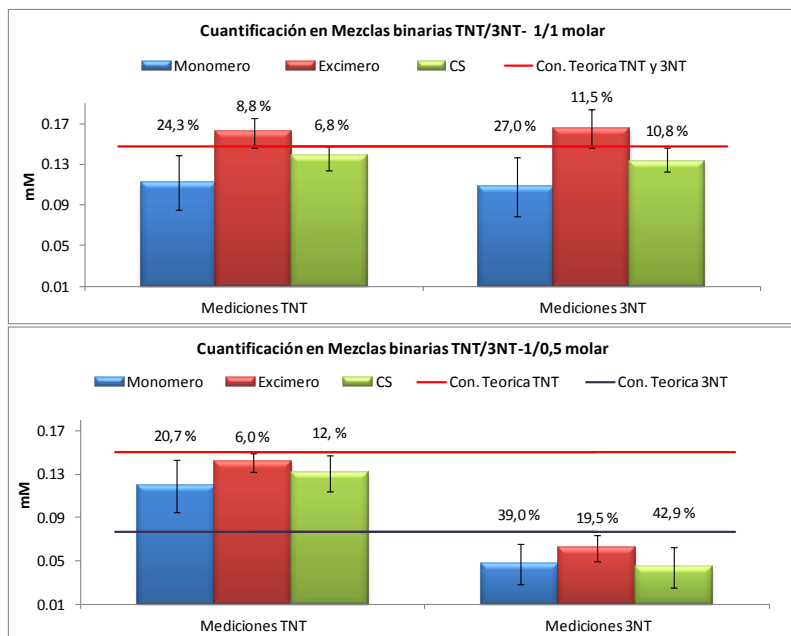


Figura 18. Cuantificación de TNT en mezclas binarias con el interferente 3-nitrotolueno con una relación molar TNT/3NT 1:1 (arriba) y 1:0,5 (abajo).

En las mezclas ternarias se analizó TNT con los interferentes NB y 3NT, Los errores cuantificados para la determinación de TNT en la relación molar TNT/NB/3NT fueron inferiores al 11,0 % para la relación molar 1:1:1 y no superaron el 9,2 % para la relación 1:0,5:0,5. Estos datos indican un buen nivel de cuantificación de TNT en las mezclas teniendo presente su similitud estructural con los otros nitrocompuestos.

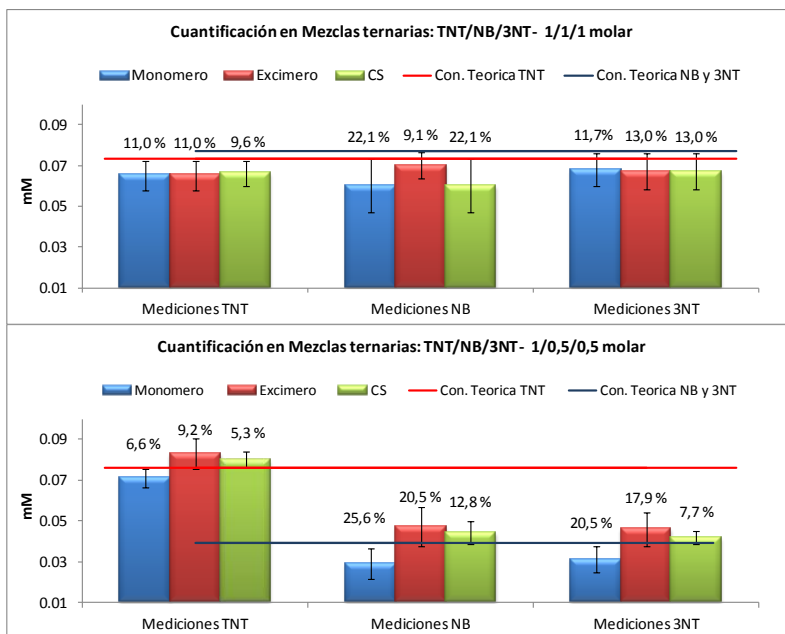


Figura 19. Cuantificación de TNT en mezclas ternarias con los interferentes 3-nitrotolueno y nitrobenzeno con una relación molar 1:1:1 arriba y 1:0,5:0,5 abajo.

Por lo tanto, se demuestra la versatilidad del sistema híbrido CS@Py, no sólo como sensor fluorescente de triple canal en la detección de nitrocompuestos, sino como método analítico para la cuantificación de TNT en presencia de otros nitrobenzenos, **tabla 5 y figuras 18 y 19.**

3. RESUMEN DE ARTÍCULOS PUBLICADOS RELACIONADOS CON LA TESIS

Tabla 5. Cuantificación de TNT en las mezclas ternarias
(TNT:NB:3NT).

Canal	Concentración estimada (mM)					
	Relación molar 1:0,5:0,5 ^a TNT:NB:3NT			Relación molar 1:1:1 ^b TNT:NB:3NT		
	C _{TNT} (E%)	C _{NB} (E%)	C _{3NT} (E%)	C _{TNT} (E%)	C _{NB} (E%)	C _{3NT} (E%)
Monómero	0,071 (6,6)	0,029 (25,6)	0,031 (20,5)	0,065 (11,0)	0,06 (22,1)	0,068 (11,7)
Excímero	0,083 (9,2)	0,047 (20,5)	0,046 (17,9)	0,065 (11,0)	0,07 (9,1)	0,067 (13,0)
Nanopartícula	0,080 (5,3)	0,044 (12,8)	0,042 (7,7)	0,066 (9,6)	0,06 (22,1)	0,067 (13,0)

^a Las concentraciones teóricas de 0,076 mM para TNT y 0,039 mM para NB y 3NT.

^b Las concentraciones teóricas de 0,073 mM para TNT y 0,077 mM para NB y 3NT.

3-3. Conclusiones

Las nanopartículas core-shell CS (CdSe/ZnS) decoradas con pireno, CS@Py pueden ser utilizadas como una sonda fluorescente con tres canales independientes (única longitud de onda de excitación y emisión de tres señales longitudes de onda distintas).

Estos nanohíbridos pueden ser utilizados para analizar mezclas de nitrocompuestos con estructuras y constantes de desactivación similar, únicamente usando la información de la intensidad de la fluorescencia de los tres canales. Como una prueba de este principio, fué ensayado para la cuantificación rápida y sencilla de TNT en presencia de interferentes de estructuras similares.

Adicionalmente, los tiempos de vida de la emisión de fluorescencia pueden duplicar la información y mejorar mucho más la versatilidad del nanohíbrido en detección.

La estrategia para la construcción de una sonda de tres canales emisivas puede ser aplicada en el diseño de otro tipo de nanohíbridos con distintos cromóforos orgánicos que generen excímeros y exciplejos en la periferia de la nanopartícula.

4. TÉCNICAS EXPERIMENTALES UTILIZADAS EN EL DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN



Espectroscopia de Absorción Ultravioleta-Visible (UV-Vis)

Los espectros de absorción se obtuvieron con un espectrofotómetro Agilent 8453 (**figura 4.1**) equipado con software de UV-Vis scanning ChemStation. Las medidas fueron registradas a temperatura ambiente usando cubetas de cuarzo de 1x1x4 cm. (**figura 4.2**).



Figura 4.1. Espectrofotómetro UV-Vis



Figura 4.2. Cubetas de cuarzo

Espectroscopia de Emisión de Fluorescencia

Fluorescencia en estado estacionario.

La adquisición de los espectros de emisión se ha llevado a cabo mediante un espectrofluorímetro Photon Technology International (PTI), modelo LPS-220B (**figura 4.3**), equipado con una lámpara de Xenón de 75 W y de detectores de recuento de fotones individuales entre 200 y 900 nm. Las medidas se registraron a temperatura ambiente en nitrógeno con cubetas de cuarzo de 1x1x4 cm.



Figura 4.3. Espectrofluorímetro.

Fluorescencia resuelta en el tiempo.

Los tiempos de vida se han registrado con el fluorímetro indicado anteriormente equipado con módulos de Time Master Fluorescent Lifetime Spectrometer TM- 2/2003. Como fuente de excitación se utilizó con un Laser PTI modelo GL-3300 de nitrógeno (**figura 4.4**) el cual proporciona pulso de laser a 337 nm y una duración de 1 ns. Además, el equipo presenta un módulo de colorantes modelo L-302, el cual permite variar la longitud de onda de excitación.



Figura 4.4. Espectrofluorímetro acoplado al laser de nitrógeno.

Fotólisis de destello láser (LFP)

Los experimentos de fotólisis de destello láser se han realizado utilizando el tercer armónico (355 nm) y cuarto armónico (266 nm) de un láser Nd:YAG- Quantel Brilliant LP 151 (**figura 4.5**). La duración del pulso fue de 10 ns, con una energía de 12-18 mJ/pulso y una frecuencia de 10 Hz, se ha utilizado una lámpara de Xenón Lo 255 Oriel como detector de luz.

El aparato consta del láser pulsado, la lámpara de xenón, un monocromador y un sistema fotormultiplicador. La señal saliente desde el osciloscopio se almacenó en un ordenador personal.



Figura 4.5. Láser de Nd:YAG.

Esta técnica permite estudiar las reacciones de especies transitorias tales como los radicales, los estados excitados o iones, en los sistemas químicos y biológicos.

Microscopia Electrónica de Transmisión de Alta Resolución (HRTEM)

Las imágenes de HRTEM se realizaron en un microscopio electrónico de transmisión de 200KV TECNAI F20 (**figura 4.6**), equipado con una cámara GATAN y el software Digital Micrograph. Las muestras fueron depositadas en rejillas de cobre con recubrimiento de carbono (**figura 4.7**) 24 horas antes de su medición, previamente diluidas en tolueno o cloroformo y puestas a secar al aire. El tamaño de la muestra se indica en nanómetros (nm). El software ImageJ fue utilizado para determinar el tamaño de las nanopartículas, con recuentos mínimos de 250 unidades.



Figura 4.6. Microscopio
TECNAI F20.

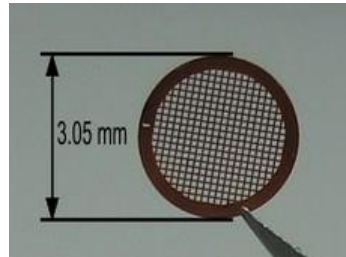


Figura 4.7. Rejillas para el TEM en
Cobre.

Espectrometría de resonancia magnética nuclear de protón ^1H

RMN

Los espectros de protón (^1H RMN) se realizaron en un espectrómetro AVANCE DRX 300 Brüker con una sonda a 300 MHz que posee un imán Brüker de 7 Tesla apantallado, y un espectrómetro AVANCE 400 Brüker con una sonda de 400 MHz que posee un imán Oxford de 9.3 Tesla (**figura 4.8**). Los desplazamientos químicos (δ) se dan en partes por millón (ppm) relativos al tetrametilsilano (TMS), tomando como referencia interna la señal residual de ^1H del disolvente deuterado. Los valores de las constantes de acoplamiento (J) se expresan en Hz.



Figura 4.8. Espectrofotómetros de RMN de 300 y 400 MHz.

Cromatografía de capa fina (CCF o TLC)

Se ha realizado sobre cromatóforos de sílica gel 60 F₂₅₄, Marca Merck utilizando lámpara UV a una longitud de onda de 254nm para el revelado.

Cromatografía en columna

Se ha realizado utilizando sílica gel 60 (0.040-0.063mm) para cromatografía en columna y hexano/acetato de etilo como eluyentes (en algunos casos se modificaron estos teniendo en cuenta la polaridad de los componentes a separar).

Disolventes y Reactivos

Los diferentes reactivos utilizados han sido suministrados por Sigma-Aldrich y Fluka. Los disolventes fueron grado analítico.

Las nanopartículas del tipo core-shell de CdSe/ZnS utilizadas fueron suministrados por Ocean Nano Tech LLC.

Tabla 4.1 Lista de reactivos y su grado de pureza según las etiquetas de los productos.

Lista de reactivos	Pureza
Pireno	99.0 %
1-Metilpireno	97.0 %
1-pirenobutanol	99.0 %
11-Mercapto undecanol acido	98.0 %
HfCl ₄ ·THF	99.9 %
Acetato de etilo	99.7 %
Hexano	95.0 %
Cloroformo CCl ₃	99.8 %
Diclorometano CH ₂ Cl ₂	99.9 %
Tetrahidrofurano	99.9 %
Tolueno	99.9 %
Core Shell	ND
Oxido de Cadmio (CdO)	99.9 %
Acido Tetradecilfosfonico (TDAP)	97.0 %
Oxido de trioctilfosfina (TOPO)	99.0 %
Trioctilfosfina (TOP)	97.0 %
Selenio (Se)	99.9 %
Metanol	99.8 %
Nitrobenzeno (NB)	99.0 %
2-Nitroanilina (2-NA)	98.0 %
3-Nitroanilina (3-NA)	98.0 %
4-Nitroanilina (4-NA)	99.0 %
4-Metil-3-Nitroanilina (4-M-3-NA)	97.0 %
2-Metil-4-Nitroanilina (2-M-4-NA)	97.0 %
2-Nitrotolueno (2-NT)	99.0 %
3-Nitrotolueno (3-NT)	99.0 %
4-Nitrotolueno (4-NT)	99.0 %
2,4 Dinitrotolueno (2,4-DNT)	97.0 %
2,6 Dinitrotolueno (2,6-DNT)	97.0 %



5. JUSTIFICACIÓN DEL TEMA Y CONTRIBUCIÓN ORIGINAL DEL AUTOR



5. JUSTIFICACIÓN DEL TEMA Y CONTRIBUCIÓN ORIGINAL DEL AUTOR

Esta tesis ha sido desarrollada en el Grupo de Reactividad Fotoquímica (**GRF**) del Instituto de Ciencia Molecular (ICMol) de la Universidad de Valencia, cuyas instalaciones se encuentran ubicadas en el Parc Científic de la Universidad.

Desde hace más de una década el **GRF** se ha centrado en el campo de las propiedades fotofísicas de moléculas, macromoléculas y supramoléculas fotoactivas, sumado a la síntesis y desarrollo de nuevos sistemas fotoactivos, especialmente nanopartículas metálicas, nanocristales semiconductores como CdSe y CdSe/ZnS, perovskitas, nanopartículas de “up-conversión”, dopadas con lantánidos, entre otras. Estos sistemas han evidenciado aplicación para el reconocimiento molecular y en dispositivos luminiscentes, entre otras aplicaciones.

El grupo de investigación ha mostrado gran interés en la comprensión de los fenómenos fotofísicos que ocurren en los nuevos nanosistemas nanopartícula-cromóforo orgánico y el papel de ligandos en las propiedades luminiscentes de los nanomateriales para optimizar su potencial aplicación como sensor.

La supervisión de la tesis doctoral ha estado a cargo de la catedrática **Julia Pérez Prieto** y la Dra. **Raquel E. Galian**. El objetivo de esta tesis ha sido analizar la posible simbiosis entre nanopartículas semiconductoras de CdSe y CdSe/ZnS y

un fluoróforo, específicamente pireno, en la capa orgánica de la nanopartícula, para obtener sensores fluorescentes (**objetivos 1,2 y 4**).

Además, se planteó ampliar y profundizar en el conocimiento de los procesos de desactivación de la fluorescencia del pireno por diferentes nitrocompuestos aromáticos (2-nitroanilina, 3-nitroanilina, 4-nitroanilina, 2-metil-4-nitroanilina, 4-metil-3-nitroanilina, 4-metil-3,5-dinitroanilina), los cuales tienen gran interés en múltiples áreas como la medicina, biología y química (**objetivo 3**).

En relación al **primer y segundo objetivo**, el principal reto conseguido fue obtener nanohíbridos CdSe@Py con dos canales fluorescentes independientes. La nanopartícula actúa como portadora de una elevada concentración de pireno y permite la observación de la emisión del monómero y excímero del pireno en muestras diluidas del fluoróforo. Se demuestra la versatilidad del nanohíbrido para detectar nitroanilinas y nitrocompuestos aromáticos.

Con respecto al **objetivo 3**, se avanzó en la comprensión de los mecanismos de desactivación de la fluorescencia del pireno (monómero) por nitroanilinas. Se demuestra i) que las nitroanilinas son fuertes desactivadores de la emisión de fluorescencia del pireno, ii) la desactivación combinada (estática-dinámica) para las nitroanilinas y iii) la

formación de un complejo pireno--NA en el estado fundamental y sus propiedades emisivas.

En relación al **objetivo 4**, se logró un fluoróforo con tres canales emisivos independientes por combinación de nanopartículas de CdSe/ZnS con ligandos con cromóforo orgánico de pireno. Su versatilidad como sensor de triple canal se demostró utilizando nitrocompuestos aromáticos como analitos. Además, se ha demostrado la versatilidad del nanosensor para cuantificación de TNT.

Los artículos descritos en esta tesis han sido publicados en diferentes revistas científicas con índices de impacto de 3,138 hasta 5,886 (**tabla 1**), con un número de citas aceptable por artículo publicado, teniendo en cuenta el año de publicación.

Tabla 1. Factor de impacto de las revistas y número de citas por artículo publicado.

Revista/artículo	Factor de Impacto	Numero de citas por artículo
Analytical chemistry/Pyrene-functionalized nanoparticles: two independent sensors, the excimer and the monomer	5.886	19
Chemphyschem/ Nitroanilines as Quenchers of Pyrene Fluorescence	3.138	6
RSC Advances/ Three independent channel nanohybrids as fluorescent probes	3.289	0

La experiencia y conocimiento adquirido durante estos años permitirán al grupo avanzar en el desarrollo de sensores

más eficientes y selectivos, así como en el ensamblaje de materiales para obtener nuevos sistemas híbridos de multicanal.

Durante el período de su tesis doctoral, el Ingeniero **Carlos E. Agudelo-Morales** ha adquirido experiencia en la síntesis, caracterización, y/o funcionalización de nanopartículas semiconductoras de CdSe del tipo core y core-shell. Además, ha adquirido conocimiento en técnicas experimentales de la química orgánica y técnicas analíticas. El estudio de las propiedades fotofísicas de los sistemas híbridos sintetizados le ha permitido adquirir conocimientos en el área de la nanotecnología, fotofísica y fotoquímica.

La aportación del Ingeniero **Carlos E. Agudelo-Morales** al trabajo experimental de la tesis ha sido importante: la síntesis y funcionalización de las nanopartículas semiconductoras, la preparación de los ligandos y el TNT, las medidas de absorbancia, fluorescencia en estado estacionario y tiempo resuelto. Los estudios de fotólisis de destello láser fueron realizados en el grupo de Reactividad Fotoquímica-ICMol y las mediciones de RMN se realizaron en los servicios de apoyo a la investigación de la Universidad de Valencia, utilizando el espectrómetro Brüker AVANCE DRX 300 en los análisis de rutina realizados por los técnicos del servicio. Las mediciones de Microscopia Electrónica de Transmisión de Alta Resolución-HRTEM se realizaron igualmente en el Servicio Central de Apoyo a la Investigación Experimental- Sección

5. JUSTIFICACIÓN DEL TEMA Y CONTRIBUCIÓN ORIGINAL DEL AUTOR

Microscopia, con apoyo del personal técnico responsable del servicio.

En el artículo “*Nitroanilines as Quenchers of Pyrene Fluorescence*” el Dr. Oscar F. Silva, investigador posdoctoral visitante en el grupo durante el año 2012, realizó los estudios preliminares.

En el artículo “*Three independent channel nanohybrids as fluorescent probes*” la licenciada Soranyel González-Carrero, actualmente estudiante de doctorado en el grupo de investigación, colaboró en los estudios fotofísicos del sistema híbrido.



6. RESUMEN DE LA TESIS



Esta investigación se centró en el desarrollo de un sistema híbrido organico-inorganico, con múltiples señales emisivas a distintas longitudes de onda, y su evaluación como herramienta analítica selectiva y de cuantificación de nitrocompuestos aromáticos.

El sistema híbrido consistió por una parte, en nanopartículas semiconductoras específicamente se utilizó nanocristales de tipo CdSe (core) y CdSe/ZnS (core shell). Estos nanohíbridos se eligieron por su potencial aplicación como sensores.

El componente orgánico consistió en ligandos funcionales que presentan un fluoróforo específicamente de pireno (Py). Este fluoróforo fue elegido, por su buena fotoestabilidad y la sensibilidad de sus propiedades luminiscentes al entorno. El pireno tiene una emisión bien resuelta en la zona de 340-420 nm que corresponde al monómero. A concentraciones del orden mili-molar se observa la formación del excímero, cuyo máximo de emisión se encuentra a 470 nm.

Con el propósito de garantizar una buena estabilidad y pasivación de las nanopartículas se utilizó un ligando con un grupo anclante de tipo tiol específicamente [11-mercaptoundecanoato de 4-(pirenil-1-il) butilo], el grupo tiol es muy afín a la superficie de los QD. El otro extremo de la cadena alquílica del ligando presenta la unidad de pireno.

En el **capítulo 3.1** de esta tesis, se presenta la funcionalización de la superficie de las nanopartículas del tipo core (CdSe) con pireno como ligando (QD@Py). Se demuestra que la elevada área superficial relativa (superficie/volumen) de la nanopartícula permite alojar eficazmente una gran cantidad de estos ligandos, y por lo tanto una alta concentración local del pireno.

Los análisis por espectroscopia de absorción y resonancia magnética nuclear evidenciaron que el pireno se encontraba unido a la superficie de la nanopartícula, presentando las bandas de absorción correspondientes del pireno sobre 300-380 nm. Las imágenes de microscopia electrónica de transmisión de alta resolución corroboraron los tamaños y la homogeneidad de la muestra (nanopartículas de $2,4 \pm 0,4$ nm).

La funcionalización de este tipo de nanopartículas, con el tiol, produjo una fuerte desactivación de la emisión de la fluorescencia de la nanopartícula. Las medidas de la fluorescencia en estado estacionario y resueltas en el tiempo, demostraron formación de las dos especies emisivas del pireno (monómero y el excímero), que confirma una alta concentración local de pireno en la periferia de la nanopartícula. El tiempo de vida de fluorescencia para el monómero mostró una cinética de decaimiento radiativo biexponencial con tiempos de vida de 10 ns (62%) y 108 ns (38%), mientras que para la señal del excímero mostró una sola componente de 57 ns (100%).

La capacidad del QD@Py como sensor fué analizada utilizando una variedad de compuestos nitroarómicos como analitos: nitroanilinas [3-nitroanilina (3-NA) y 4-nitroanilina (4-NA)] y nitrobenenos [nitrobeneno (NB), 4-nitrotolueno (4-NT), 2,4-dinitrotolueno (2,4-DNT), 2,6-dinitrotolueno (2,6-DNT)].

Las intensidades de fluorescencia del monómero y el excímero de QD@Py se desactivan con concentraciones crecientes de todos los analitos y, con la excepción de la 4-NA, se ajustan a la ecuación de *Stern-Volmer*. La desactivación de la emisión del excímero no fue sensible a la desactivación del monómero, mostrando ser un canal independiente. Por otra parte la capacidad del sistema híbrido QD@Py para encapsular a los analitos dependiendo de su naturaleza, juega un papel clave en la sensibilidad de los calaes por el analito.

En el **capítulo 3-2** se realizó un estudio sistemático sobre las diferentes interacciones fotofísicas entre el pireno, 1-metilpireno y nitroanilias (2-, 3-, y 4-NA), metilnitroanilinas (4-metil-3-nitroanilina, 4-M-3-NA y 2-metil-4-nitroanilina, 2-M-4-NA) y una dinitroanilina (4-metil-3,5-dinitroanilina, 4-M-3,5-DNA) en los disolventes tolueno y 1,4-dioxano.

Los gráficos de la dependencia de la emisión del pireno con la concentración del analito demostraron que las nitroanilinas son fuertes desactivadores de la emisión de fluorescencia del pireno y 1-metilpireno.

Se encontró que las desactivaciones de la fluorescencia del pireno por la 2-, y 4-NA, presentan desviación de la linealidad. La dependencia de la fluorescencia del pireno con la concentración de analito se ajusta al modelo “*esfera de acción*”, que tiene en consideración la formación de un complejo pireno--analito. Además, se halló variaciones en las bandas de emisión del pireno al incrementar las cantidades de 4-NA y 2-M-4NA, demostrando un cambio en el entorno local del fluoróforo.

Se demuestra la formación de un complejo en estado fundamental Py--4-NA y Py--2-NA. En la mezcla pireno--3-NA se apreció la formación de un exciplexo $^1\text{Py--NA}$ emisivo.

Los espectros de absorción resueltos en el tiempo demuestran que la concentración de triplete (^3Py) formado no se ve afectado por la presencia de las NAs. Teniendo en cuenta la eficiencia de estos analitos como desactivadores del estado excitado singlete (^1Py), estos datos indican la formación de exciplexos ($^1\text{Py--NA}$) que se desactivan dando lugar a la formación del ^3Py .

En el **capítulo 3-3**, se presenta la funcionalización de nanopartículas comerciales de tipo core-shell CS CdSe/ZnS, con un diámetro 8.8 ± 1.6 nm y emisión en 640 nm con el ligando [11-mercaptoundecanoato de 4-(pirenil-1-il) butilo]. Los espectros de emisión de CS@Py evidenciaron la emisión

del monómero (370-390 nm), y excímero (480 nm) del pireno, así como del CS a 640 nm.


Los estudios de fluorescencia resueltos en el tiempo mostraron que las cinéticas de decaimiento de la fluorescencia del pireno son similares al sistema QD@Py, con valores de tiempo de vida para el monómero de 15,9 ns (64,0%) y 87,4 ns (35,9%), y de 53,3 ns (100%) para el excímero. La emisión de la nanopartícula presenta un tiempo promedio de 38,4 ns.

En este capítulo, se presenta la desactivación de la fluorescencia de los tres canales emisivos del (CS@Py) por los nitrocompuestos: [nitrobenzono (NB), 2-nitrotolueno (2-NT), 3-nitrotolueno (3-NT), 4-nitrotolueno (4-NT), 2,4-dinitrotolueno (2,4-DNT), 2,6-dinitrotolueno (2,6-DNT), 2,4,6-trinitrotolueno (TNT)].

Se observa dependencia lineal de la intensidad de fluorescencia de los canales en función de las concentraciones de todos los nitrocompuestos. Para todos los nitrocompuestos, las constantes de desactivación K_{sv} ⁶⁶ y K_d ⁶⁷ de las especies emisivas del pireno son similares, lo que evidenció desactivación predominantemente dinámica. Sin embargo, en la nanopartícula el mecanismo es predominantemente estático.

⁶⁶ Constante de desactivación estática de la fluorescencia de *Stern-Volmer*.

⁶⁷ Constante de desactivación dinámica de la fluorescencia.



La eficiencia en la desactivación de la fluorescencia depende del nitrocompuesto analizado, siendo mejor para el 2,6-DNT y TNT.

Los valores del límite de detección (*LOD*), y del límite de cuantificación (*LOQ*), se encuentran por debajo de 0,13 ppm y 0,42 ppm respectivamente. Esto demuestra la alta sensibilidad del sistema hacia los analitos e indica que pueden detectarse a nivel de trazas. Finalmente, se realizó la cuantificación del TNT en mezclas binarias y ternarias, de nitrocompuestos específicamente, TNT:NB, TNT:3-NT, y TNT:NB:3-NT. En todos los casos se obtienen buenos resultados de cuantificación para el TNT, teniendo en cuenta la analogía estructural con los otros nitrocompuestos.

7. CONCLUSIONES



Los logros alcanzados en esta tesis se resumen en:

- La alta relación superficie/volumen de las nanopartículas de CdSe ha sido utilizada para obtener una alta concentración local de unidades de pireno en la periferia de la nanopartícula, permitiendo la aparición de las especies emisivas correspondientes (monómero y excímero) a bajas concentraciones de pireno.
- Las propiedades de detección del sistema funcionalizado nanopartícula@pireno se investigó mediante el uso de distintos compuestos nitroaromáticos [3-nitroanilina y 4-nitroanilina] y nitrobenzenos [nitrobenzeno, 4-nitrotolueno, 2,4-dinitrotolueno y 2,6-dinitrotolueno.
- El sistema híbrido actúa como un sensor, fluorescente de dos canales independientes, en el que la desactivación de la emisión de fluorescencia del excímero, inducida por un desactivador, se ve poco afectada por la desactivación del monómero del pireno. La capacidad de encapsulación de las nanopartículas juega un papel muy importante en su sensibilidad al analito.
- La eficiencia de desactivación de fluorescencia del pireno por las NAs en disolventes con baja polaridad (tolueno y 1,4-dioxano) se correlaciona mejor con el momento dipolar de las NAs, el cual decrece en el orden 2-M-4-NA > 4-NA >> 3-NA > 4-M-3-NA > 4-M-3,5-DNA > 2-NA⁵⁰, o incluso su hiperpolarizabilidad (β), la cual decrece en el orden 4-

NA>2-NA>3-NA⁵⁹, que con su potencial redox, el cual decrece en el orden 3-NA>2-NA>4NA .

- Estos cromóforos poseen una fuerte deslocalización electrónica π y transferencia de carga intramolecular por la presencia de los grupos dadores y aceptores de electrones en la molécula. Esto es particularmente relevante para las 4-NAs, cuya aparentemente desactivación estática de la fluorescencia del pireno es constante con su proximidad al fluoróforo en el estado fundamental.
- Los datos muestran que las NAs establecen fuertes interacciones, con el pireno en su estado singlete, y en algunos casos en el estado fundamental.
- Las nanopartículas core-shell CS (CdSe/ZnS) decoradas con pireno, CS@Py pueden ser utilizadas como una sonda fluorescente con tres canales independientes (única longitud de onda de excitación y emisión de tres señales longitudes de onda distintas).
- Estos Nanohíbridos pueden ser utilizados para analizar mezclas de nitrocompuestos con estructuras y constantes de desactivación similar, únicamente usando la información de la intensidad de la fluorescencia de los tres canales. Como una prueba de este principio, fué ensayado para la cuantificación rápida y sencilla de TNT en presencia de interferentes de estructuras similares.

- Adicionalmente, los tiempos de vida de la emisión de fluorescencia pueden duplicar la información y mejorar mucho más la versatilidad del nanohíbrido en detección.
- La estrategia para la construcción de una sonda de tres canales emisivas puede ser aplicada en el diseño de otro tipo de nanohíbridos con distintos cromóforos orgánicos que generen excímeros y exciplejos en la periferia de la nanopartícula.



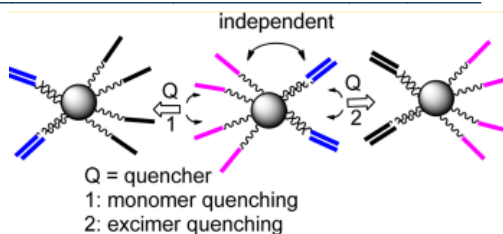
8. ARTÍCULOS PUBLICADOS RELACIONADOS CON LA TESIS



Pyrene-Functionalized Nanoparticles: Two Independent
Sensors, the Excimer and the Monomer

ABSTRACT: The high surface-to-volume ratio of nanoparticles has been used to obtain a high local concentration of pyrene units on

their periphery, making the formation of both pyrene emissive species possible using amazingly small pyrene concentrations. The sensing properties of model pyrene-functionalized nanoparticles was investigated by using different nitroaromatic compounds [m-nitroaniline and *p*-nitroaniline] and nitrobenzenes [nitrobenzene, *p*-nitrotoluene, 2,4-dinitrotoluene, and 2,6-dinitrotoluene]. The hybrid system acts as a dualfluorescence sensor, in which the decrease of the pyrene emission, induced by the quencher, is hardly reflected in the pyrene excimer emission. The encapsulation capacity of the NPs also plays a key role in their sensitivity to the analyte.



Pyrene is widely used as a probe because of its absorption features, its considerably long singlet lifetime, and the information that can be obtained from its fluorescence emission.^{1,2} Pyrene fluorescence has been applied to acquire information about the structure and dynamics of macromolecular systems, surface properties, and adsorption sites as well as in fluorescent chemosensors that can recognize chemical species selectively.³⁻⁵

Pyrene displays not only a well-defined monomer (M) emission at 370–430 nm, but at high molar concentrations it also exhibits an efficient emission at ~480 nm due to excimer (E) formation. Differential M and E quenching has recently been reported as a method for detecting electron-deficient molecules using millimolar pyrene solutions.⁶ Pyrene excimer quenching reflects the reduced pyrene singlet excited state population as well as the dynamic quenching of E itself.

Metal and semiconductor spherical nanoparticles (NPs) exhibit unique properties, such as a high surface-to-volume ratio. They can be capped with ligands which have an anchoring atom (such as sulfur, phosphorus, or nitrogen) at one end which exhibits affinity for the NP surface. The other end of the ligand can be used for introducing high functionality at the NP periphery. This strategy has been implemented for the preparation of colloidal solutions of pyrene-functionalized gold NPs and core-shell quantum dots.^{7,8} In the first case, they exhibit both M and E emission if the pyrene is attached to the nanoparticle surface by a long and flexible chain.^{9,10}

However, no application of NP-pyrene hybrid systems as fluorescence sensors based on the emission quenching of both pyrene emissive species has been described to date.

We report here on highly diluted colloidal solutions of pyrene-functionalized CdSe NPs (QD@Py) exhibiting both M and E emission. Surprisingly, the decrease of the M emission by the quencher is hardly reflected in the E emission. Therefore, these systems make it possible for M and E to behave as two independent sensors.

• EXPERIMENTAL SECTION

Materials. All reagents were commercially available and used as received. The 11-mercaptoundecanol (MU) and 1-pyrenebutanol were purchased from Sigma-Aldrich. Solvents for chromatography (ethyl acetate and hexane) were reagent grade and used without further purification.

Characterization. UV-vis spectra of the samples were recorded using quartz cuvettes spectrometer in a UV-visible spectrophotometer (Agilent 8453E). The average diameter value of the nanoparticles was estimated following the method of Peng et al.¹¹

Steady-state fluorescence spectra (LPS-220B, motor driver (MD-5020), Brytebox PTI) were measured on a spectro-fluorometer (PTI), equipped with a lamp power supply and working at room temperature. The Felix 32 Analysis software was used to register the data. The fluorescence quantum yield was calculated by following the procedure of Resch-Genger et al. All the data were acquired using 1 cm × 1 cm path length quartz cuvettes. Since the nitrocompounds, mainly *p*-nitroaniline, presented absorbance at the excitation wavelength of pyrene ($\lambda_{\text{exc}} = 337$ nm), pyrene emission intensities associated with the quenching measurements were corrected for innerfiltering effects arising from the absorption of excitation radiation by the quenching species.

Time-resolved 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 coupled to the high-resolution GL-302 dye laser (dye: 2(4-biphenyl)-5-phenyl-1,3,4-oxadiazole, PBD, 5×10^{-3} M in toluene/ethanol: 1/1). The kinetic traces were fitted by mono or biexponential decay functions and reconvolution of the instrument response function. The accuracy of the fits was evaluated by the reduced χ^2 values ($0.8 \leq \chi^2 \leq 1.2$).

Images from the QDs were obtained by high-resolution transmission electron microscopy (HRTEM, FEI Tecnai G2 F20) at an accelerating voltage of 200 kV. Samples were prepared by dropping the colloidal solution on a Lacey Formvar/carbon-coated copper grid. The digital analysis of the HRTEM micrographs was done using digital MicrographTM 1.80.70 for GMS by Gatan.

Synthesis of 4-(Pyren-4-yl) butyl-11-mercaptoundecanoate.

The Py-SH ligand was prepared following an esterification method described in the literature. In brief, 4(1-pyrenyl)butanol (722 mg, 2.6 mmol) and 11-mercaptoundecanoic acid (574 mg, 2.6 mmol) were dissolved in anhydride toluene (30 mL). A complex of hafnium/tetrahydrofuran (THF) (2 mg) was added and the mixture was heated for 48 h under azeotropic reflux conditions to remove water through a Soxhlet thimble with 3 Å molecular sieves. In order to quench the reaction, 1 mL of water was added. After solvent removal, the product was purified by column chromatography using hexane-ethyl acetate solvents (9:1). The compound was obtained in 89% yield.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 1.07-1.20 (m, 12H), 1.23 (t, $J = 7.7$ Hz; 1H), 1.43-1.57 (m, 4H), 1.68-1.93 (m, 4H), 2.21 (t, $J = 7.7$ Hz; 2H), 2.41 (q, $J = 7.0$ Hz; 2H), 3.30 (t, $J = 7.8$ Hz; 2H), 4.08 (t, $J = 6.3$ Hz; 2H), 7.76-7.81 (d, $J = 7.8$ Hz; 1H), 7.88-7.96 (m, 3H), 8.00-8.11 (m, 4H), 8.16-8.21 (d, $J = 9.3$ Hz; 1H).

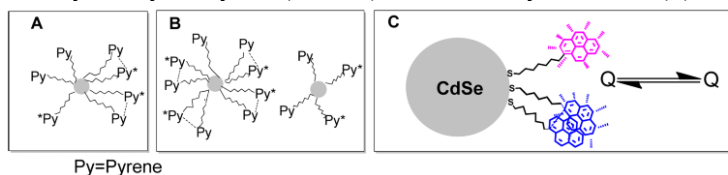
Synthesis of QD@Py. A chloroform solution (25 mL) of QD@TOPO (2.85×10^{-7} mol) and Py-SH (9.62×10^{-4} mol, [thiol]/[QD] = 3375 molar ratio) was heated to reflux under nitrogen atmosphere for 48 h. After almost total solvent evaporation (2 mL) and the addition of methanol (30 mL), the samples were centrifuged at 8 000 rpm for 20 min at 25 °C and the supernatant was decanted. The nanoparticles (QD@Py) were dissolved in toluene (2 mL), and the purification process was repeated five times in order to eliminate the unreacted ligand.

Spectroscopic Measurements. Spectroscopic measurements were performed at room temperature ($T = 295$ K) with nitrogen-purged solutions in toluene.

• RESULTS AND DISCUSSION

To obtain clear information on the behavior of the pyrene emissive species of the QD@Py nano hybrid, the emission of the QD was minimized using sulfur as the anchoring group of the pyrene ligand. The preparation of mercapto-stabilized CdSe NPs decorated with pyrene moieties (QD@Py, Scheme 1) has been previously described.¹²

Scheme 1. Schematic Representation of the Pyrene Emissive Species of the CdSe-Pyrene Hybrid System (A and B) and How the System Works (C)



The UV-vis absorption spectrum of QD@Py showed the first exciton peak of the NP at 529 nm as well as the presence of pyrene (Figure S-1 in the Supporting Information). The NP size obtained by HRTEM was 2.4 ± 0.4 nm (Figure S-2 in the Supporting Information). The ^1H NMR spectrum of QD@Py (Figure S-3 in the Supporting Information) exhibited a broadening of the ligand signals which indicated that the ligand was strongly bound to the NP surface.¹³ As expected, QD@Py displayed a drastically quenched emission ($\lambda_{\text{exc}} = 450$ nm) of the CdSe core, attributed to the hole-trapping capacity of thiol molecules, see Figure 1.¹⁴⁻¹⁶

Excitation of deaerated toluene solutions of QD@Py ($1 \mu\text{M}$, absorbance of pyrene = 0.3) at $\lambda_{\text{exc}} 337$ nm displayed both M (λ_{em} at 376, 396, and 417 nm) and E (λ_{em} at 480 nm) emission, Figure 2A. Except for its small shoulder at 540 nm, the spectrum of the Py excimer emission of QD@Py was similar in range and shape to that of the pyrene excimer of Au@Py nanoparticles (see Figure S4 in the Supporting Information). By contrast, Py-SH ($40 \mu\text{M}$, absorbance of pyrene = 0.3)¹⁷ only exhibited M emission (Figure S-5 in the Supporting Information).¹⁸

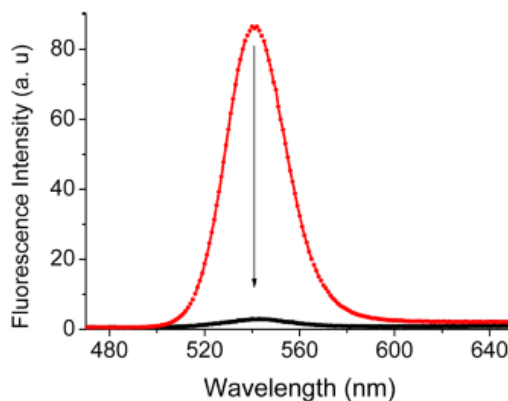


Figure 1. Fluorescence spectra ($\lambda_{\text{exc}} = 450 \text{ nm}$) of QD@TOPO (in red, $\Phi = 5.7\%$) and of QD@Py (in black) in deaerated toluene.

The QD@Py excimer emission was mainly produced by the interaction of pyrene units of the same NP, since high dilution of the colloidal solution led to an increase of the M/E emission ratio of less than 15%, at most.

Monomer fluorescence decay of QD@Py was not a single exponential but it fit to two lifetimes, belonging to short-lived monomers of $\sim 10 \text{ ns}$ lifetime (62%) and longer-lived monomers of $\sim 108 \text{ ns}$ lifetime (38%), see Figure 2B; in comparison, the lifetime of the Py-SH singlet excited state was $\sim 155 \text{ ns}$. In addition, the growth and decay of the QD@Py excimer fluorescence was monitored at 475 nm (Figure 2C) and fit to two exponentials (see eq 1) to yield the growth ($k_1 = 0.8 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) and decay ($k_2 = 1.7 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$) components.

$$I = A_0 \left[\frac{k_1}{(k_2 - k_1)} \right] (exp(-k_1 t) - exp(-k_2 t)) \quad 1$$

From the decay component, the E lifetime was estimated as $\sim 57 \text{ ns}$. The rise time of E was coincident with the decay kinetics of the short-lived M.

Time-resolved fluorescence spectra of QD@Py ($0.1 \mu\text{M}$) taken at different times after the laser pulse (Figure 3) showed the emission of M was always accompanied by other emissions at longer wavelengths than that of the monomer; detection of a shorter-lived E, which exhibited an emission maximum at about 450 nm , was followed by the longer-lived E at 475 nm .

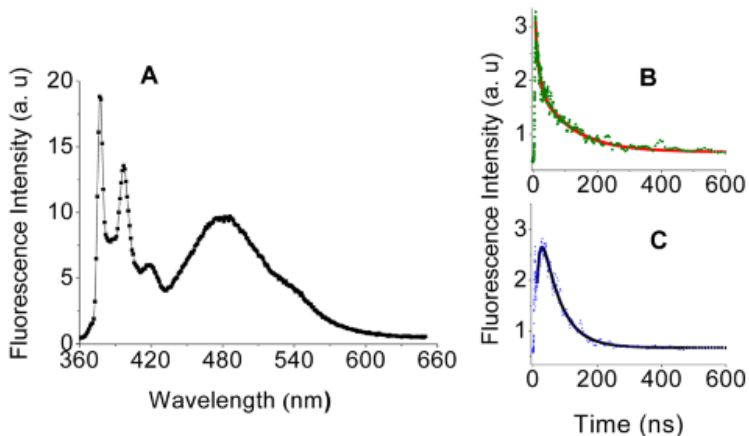


Figure 2. Fluorescence spectrum ($\lambda_{\text{exc}} = 337 \text{ nm}$) of QD@Py ($1 \mu\text{M}$) in deaerated toluene (A), kinetic decay traces of the pyrene monomer at $\lambda_{\text{em}} = 389 \text{ nm}$ (B) and of the pyrene excimer at $\lambda_{\text{em}} = 475 \text{ nm}$ (C).

A blueshifted pyrene E emission is often attributed to a partially overlapped conformation of the dimer or E.^{5, 19} In addition, these experiments showed (i) the existence of short- and longlived Ms, (ii) the fast decay of the short-lived M to give rise to E at 475 nm,²⁰ and (iii) the faster decay of E compared to longlived M (Figure 3). These findings are compatible with the coexistence of both a nonhomogeneous distribution of Py on the NP surface and a different loading of Py on different NPs (see Scheme 1A, B).

To gain insight into the sensing properties of the system, we investigated pyrene fluorescence changes when increasing amounts of different nitroaromatic compounds were added to toluene solutions of QD@Py ($1 \mu\text{M}$). The quenching effects of nitroanilines [*m*-nitroaniline (*m*-NA) and *p*-nitroaniline (*p*NA)] and nitrobenzenes [nitrobenzene (NB), *p*-nitrotoluene (*p*-NT), 2,4-dinitrotoluene (2,4-DNT), and 2,6-dinitrotoluene (2,6-DNT)] were examined.²¹

First, the quenching of Py-SH ($40 \mu\text{M}$) by the same analytes was studied. Steady-state fluorescence measurements showed the linear dependence between the decrease of M emission with the analyte concentration for the case of *m*-NA, NB, *p*-NT, 2,4-DNT, and 2,6-DNT, while it showed an upward dependence for *p*-NA (Figure S-6A in the Supporting Information).

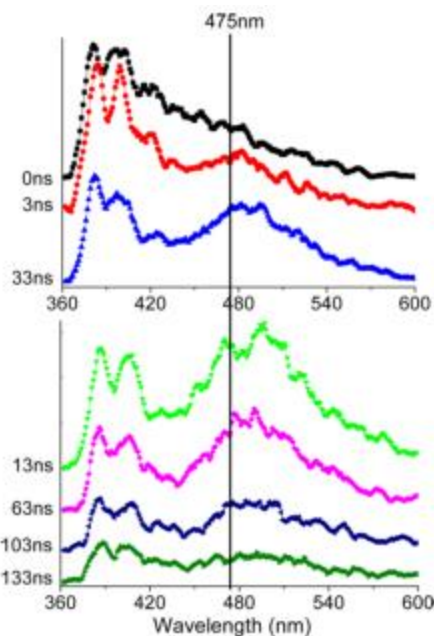


Figure 3. Time-resolved fluorescence spectra of QD@Py in deaerated toluene. The time zero corresponds to the time at which the pyrene monomer reaches maximum intensity.

Time-resolved studies confirmed that the dynamic mechanism was the main process, even in the case of *p*-NA. (Figure S6B in the Supporting Information).

The Stern-Volmer (SV) equations (eqs 2 and 3) were used to quantify the analyte quenching efficiency when a linear dependence was observed (Figure 4).

$$I_0/I = 1 + K[Q] \quad 2$$

$$\tau_f^0/\tau_f = 1 + K_d[Q] = 1 + k_q\tau_f^0[Q] \quad 3$$

In these equations, I_0 and I are the emission intensities in the absence and presence of the quencher (Q), respectively, $[Q]$ is the molar concentration of Q, and K is the SV quenching constant (eq 2). In eq 3, τ_f and τ_f^0 are the lifetimes of the excited species in the absence and presence of Q, K_d is the dynamic quenching constant, and k_q is the quenching rate constant.²²

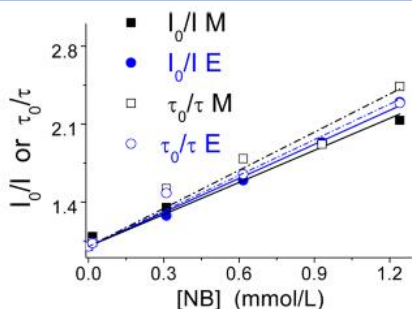


Figure 4. Stern–Volmer plots showing the intensity (continuous lines) and lifetime (dash lines) dependence of the monomer (in black, $\lambda_{em} = 390$ nm) and the excimer (in blue, $\lambda_{em} = 475$ nm) emission of QD@Py on NB concentration.

The quenching efficiency (similar values for K and K_d) varied depending on the analyte, as shown in Figure 5. The quenching constant for *p*-NA was markedly higher than that for the other nitroaromatic compounds; the quenching efficiency increased in the following order NB < *p*-NT < 2,4-DNT < *m*-NA < 2,6-DNT << *p*-NA. The dynamic quenching rate constants for the Py-SH were close to the diffusion rate constant in toluene.

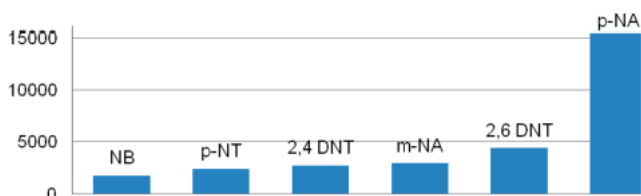


Figure 5. Comparison of the quenching constants (from Stern-Volmer plots) of Py-SH emission by the analytes.

Then, the quenching of QD@Py by the analytes was also examined using steady-state and time-resolved measurements. Interestingly, the dependence of I_0/I on $[NB]$ was similar to that of τ_0/τ on $[NB]$ for the emission of both M and E, which not only indicated the dynamic nature of the quenching of both species but also the fact that E emission quenching was practically independent of that of M (Figure 4, Table 1); this fact agrees with E arising from the short-lived M which, therefore, made slight contribution to the total M emission. As a consequence, from now on, the quenching of the M and E emission by the other analytes will be examined taking this finding into account.

Table 1. Stern Volmer Quenching Constants of the QD@Py Monomer and Excimer Emission Obtained from Steady-State (K_M , K_E) and Time-Resolved (K_{dM} , K_{dE}) Measurements^{a,b}

	K_M	K_E	$K_{M/E} \times 10^3$	K_{dM}	K_{dE}	$K_{dM/dE} \times 10^3$
<i>m</i> -NA	2 516	626	4 019	1 160	160	7 250
<i>p</i> -NA	21 925	18 092	1 211	2 482	2 483	1 000
NB	964	1 024	941	1 142	1 067	1 070
<i>p</i> -NT	1 938	1 286	1 507	296	883	335
2,4-DNT	2 029	1 384	1 466	20	508	39
2,6-DNT	2 668	1 697	1 572	194	918	211

^a K constant units: M^{-1} . ^bLinear correlation, $r^2 > 0.993$, except for K_{dM} in *p*-NT (0.922) and for K_{dE} in 2,6-DNT (0.985).

The dependence of I_0/I on the [analyte] for both the M and E emission of the QD@Py showed a similar behavior to that found for Py-SH (Figure S-7 in the Supporting Information). Thus, the SV plots were linear for all the analytes except *p*-NA. However, while the quenching efficiency increased in the following order for the monomer NB < *p*-NT < 2,4-DNT < *m*-NA < 2,6-DNT << *p*-NA, which is similar to that for Py-SH, the sequence was *m*-NA < NB < *p*-NT < 2,4-DNT < 2,6-DNT << *p*-NA for the excimer (Table 1). Remarkably, in general, the dependence of I_0/I on the [analyte] (K_M and K_E for M and E, respectively) was considerably larger than that of τ_0/τ for both M and E (K_{dM} and K_{dE} for M and E, respectively), see data in Table 1. The apparent static component may reflect the contribution to the quenching of analyte molecules, which are in close proximity to the pyrene emissive species (see Scheme 1C), i.e., it reflects the capacity of QD@Py for the encapsulation of the analyte close to areas with low and high local concentrations of pyrenes. The apparent static contribution to the quenching, estimated as $K - K_d$, increased in the following order for the monomer NB < *m*-NA < *p*-NT < 2,4-DNT < 2,6-DNT << *p*-NA and NB < *p*-NT < *m*-NA < 2,6-DNT < 2,4-DNT << *p*-NA for the excimer.

Therefore, QD@Py hybrid systems offer new opportunities for pyrene fluorophore as sensors, since they make the formation of both pyrene emissive species possible using amazingly small pyrene concentrations. In addition, the encapsulation capacity of the NP may result in an increased sensitivity to the analyte.

Moreover, these systems exhibit two independent sensing channels because E emission does not reflect M emission quenching. The sensing selectivity of these hybrid systems can be analyzed using the quenching efficiency of (i) M intensity (K_M) and (ii) E intensity (K_E) as well as the dynamic constants K_{dM} and K_{dE} (Table 1). These analyses used individually or in conjunction with some of the following parameters $K_{M/E}$, $K_{dM/dE}$, $K_{M/dM}$, and $K_{E/dE}$ can be applied to (i) differentiate between isomeric compounds, such as m- and p-NA or 2,4- and 2,6-DNT and (ii) to recognize selectively a compound in a series (see Figure 6 and Figure S8 in the Supporting Information), among other uses. Finally, it is worth mentioning that QD@Py hybrid systems remained stable and led to the same response ~ 1 year after their preparation.

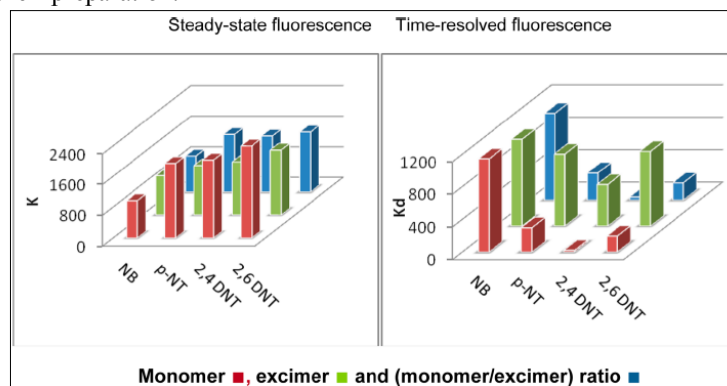


Figure 6. Comparison of the quenching constants from steady-state and time-resolved Stern–Volmer plots, K and K_d , respectively, of QD@Py monomer and excimer emission by nitrobenzenes. The monomer/excimer ratio has been multiplied by 1000.

• CONCLUSIONS

In summary, the spherical shape of NPs has been used advantageously to introduce a high local concentration of pyrene units on the NP periphery. These hybrid systems act as dual-fluorescence sensors, in which the decrease of the pyrene emission by the quencher is hardly reflected in the pyrene excimer emission. The encapsulating capacity of NPs also plays a key role in their sensitivity. These results would be of application to all types of nanoparticles, but each type of pyrene-NP hybrid could have a different sensor response because the NP imprints its own particular characteristics. These studies would be particularly interesting for the case of highly fluorescent quantum dots such as

CdSe/ZnS, since the pyrene-QD nanohybrids could function as a triple-fluorescent system.

• ASSOCIATED CONTENT

* Supporting Information

Absorption spectrum, time-resolved emission spectra of QD@Py, and additional Stern–Volmer plots. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

• AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Julia Pérez-Prieto: fax, 34 963543576; phone, 34 963543050; e-mail, julia.perez@uv.es. Raquel E. Galian: fax, 34 963543274; phone, 34 963544307; e-mail, raquel.galian@uv.es.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

• ACKNOWLEDGMENTS

This article is dedicated to Professor Miguel Angel Miranda on the occasion of his 60th birthday. We thank MEC (Project CTQ2011-27758 and the RyC contract to R.E.G) and GVA (Project GVACOMP/2011/269, Santiago Grisolia grant to C.E.A.) for their support.

• REFERENCES

- (1) Bohne, C.; Abuin, E. B.; Scaiano, J. C. *J. Am. Chem. Soc.* 1990, 112, 4226.
- (2) Murov, S. L.; Carmichael, I.; Hug, G. L. *Handbook of Photochemistry*; Marcel Dekker: New York, 1992.
- (3) Patel, A. B.; Khumsupan, P.; Narayanaswani, V. *Biochemistry* 2010, 49, 1766.
- (4) Schazmann, B.; Alhashimy, N.; Diamond, D. J. *Am. Chem. Soc.* 2006, 128, 8607.
- (5) Tadesco, V. R.; Basheer, A. R.; Kamat, V. P. *Macromolecules* 1986, 19, 2390.
- (6) Focsaneanu, K.-S.; Scaiano, J. C. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2005, 4, 817.
- (7) Ipe, B. I.; Thomas, K. G. *J. Phys. Chem. B* 2004, 108, 13265.
- (8) Amelia, M.; Lavie-Cambot, A.; McClenaghan, N. D.; Credi, A. *Chem. Commun.* 2011, 47, 325–327.

- (9) It has been shown that NPs capped with pyrene using a short linker usually do not exhibit excimer emission. See refs 7 and 8.
- (10) Chen, W.; Zuckerman, N. B.; Konopelski, J. P.; Chen, S. *Anal. Chem.* 2010, **82**, 461–465.
- (11) Yu, W. W.; Qu, L.; Guo, W.; Peng, X. *Chem. Mater.* 2003, **15**, 2854.
- (12) Aguilera-Sigalat, J.; Sanchez-SanMartín, J.; Agudelo-Morales, C. E.; Zaballos, E.; Galian, R. E.; Pérez-Prieto, J. *ChemPhysChem* 2012, **13**, 835–844.
- (13) The NMR spectrum also showed some resolved signals which could be attributed to small quantities of Py-SS-Py disulfide.
- (14) Bullen, C.; Mulvaney, P. *Langmuir* 2006, **22**, 3007.
- (15) Koole, R.; Schapotschnikow, R.; de Mello, P.; Donega, C.; Vlugt, T. J. H.; Meijerink, J. *ACS Nano* 2008, **2**, 1703.
- (16) Munro, A. M.; Plante, H. J.-L.; Ng, M. S.; Ginger, D. S. *J. Phys. Chem. C* 2007, **111**, 6220.
- (17) We have estimated the average of pyrene units on the nanoparticles as 40 units by nanoparticle using the molar absorption coefficient of the pyrene chromophore.
- (18) Though pyrene emission was quenched 30% by the QD core, the detected intensity is enough to permit the use of the hybrid system in sensing.
- (19) Matsui, J.; Mitsuishi, M.; Miyashita, T. *J. Phys. Chem B* 2002, **106**, 2468.
- (20) Dyke, D. A. V.; Pryor, B. A.; Smith, P. G.; Topp, M. R. *J. Chem. Educ.* 1998, **75**, 615.
- (21) Excitation at 450 nm showed that the core emission ($\lambda_{\text{emi}} = 540 \text{ nm}$) was not quenched by the analytes.
- (22) Data for *p*-NA fit well to the Perrin static quenching model: $\ln(I_0/I) = K[Q]$; this model describes the static quenching between randomly distributed fluorophores and quenchers that are located in the proximity. Turro, N. J. *Modern Molecular Photochemistry*; Benjamin Cummings Publishing Co.: Menlo Park, CA, 1978.

Supporting Information
Pyrene-Functionalised Nanoparticles: Two Independent
Sensors – the Excimer and the Monomer

TABLE OF CONTENTS

Figure S1. Absorption spectrum of QD@Py in toluene.

Figure S2. HRTEM image of QD@Py.

Figure S3. ¹H-NMR spectrum of QD@Py and Py-SH.

Figure S4. Fluorescence spectrum ($\lambda_{exc} = 335 \text{ nm}$) of Au@Py nanoparticles in deaerated toluene

Figure S5. Fluorescence spectrum ($\lambda_{ex}=345 \text{ nm}$) of Py-SH in deaerated toluene.

Figure S6. Stern-Volmer plots showing the intensity and lifetime dependence of the monomer emission of Py-SH on analyte concentration.

Figure S7. Stern-Volmer plots showing the intensity and lifetime dependence of the monomer emission of QD@Py on analyte concentration.

Figure S8. Comparison of the quenching constants K and K_d of QD@Py monomer (in red) and excimer (in green) emission by the nitroanilines and nitrobenzenes obtained from steady-state (A) and time-resolved (B) studies, respectively, as well as comparison of the K/K_d ratios for the monomer and the excimer (C).

Experimental Section

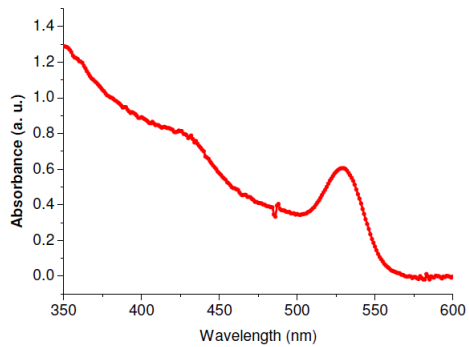


Figure S1. Absorption spectrum of QD@Py in toluene.

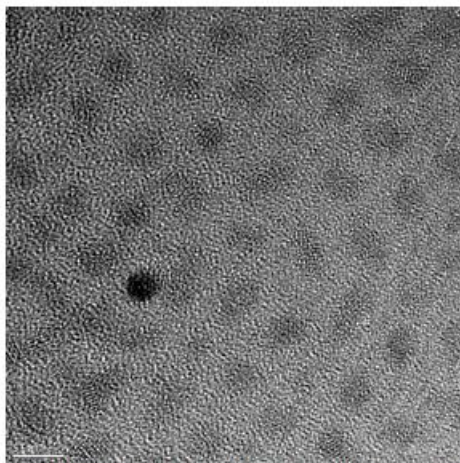


Figure S2. HRTEM image of QD@Py (scale bar, 5 nm).

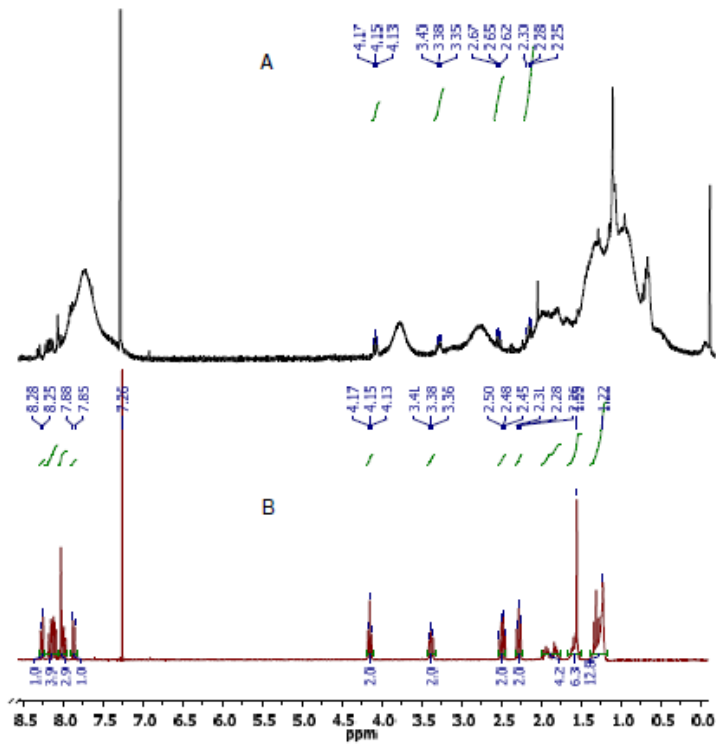


Figure S3. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of QD@Py (A) and Py-SH (B).

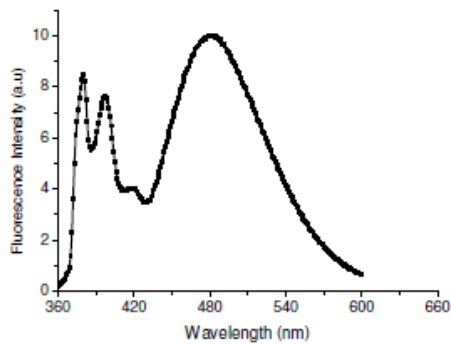


Figure S4. Fluorescence spectrum ($\lambda_{\text{ex}} = 335 \text{ nm}$) of Au@Py nanoparticles (size: 3.2 nm) in deaerated toluene.

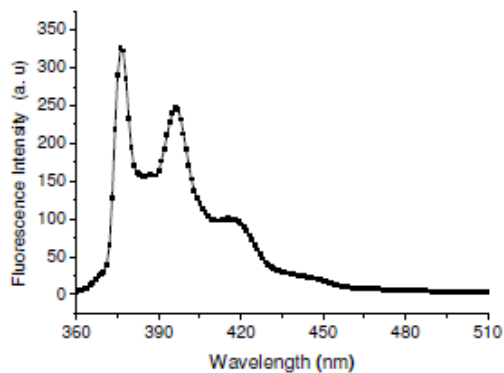


Figure S5. Fluorescence spectrum ($\lambda_{ex}=345$ nm) of Py-SH (40 μ M) in deaerated toluene.

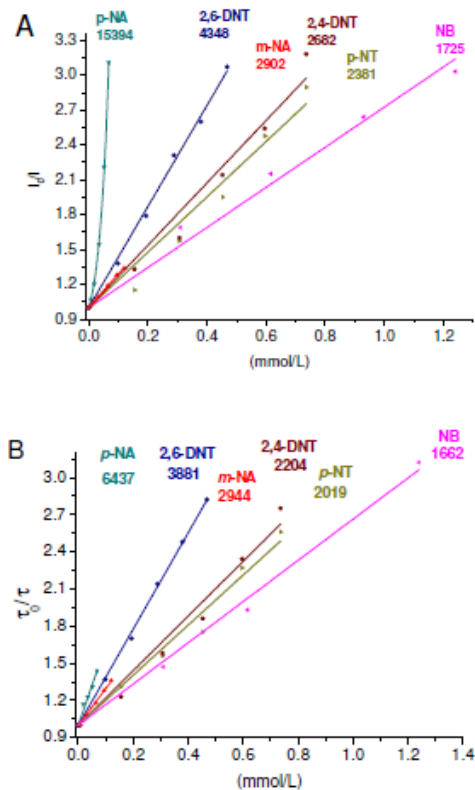


Figure S6. Stern-Volmer plots showing the intensity (A) and lifetime (B) dependence of the monomer ($\lambda_{em}=377$ nm) emission of Py-SH on analyte concentration.

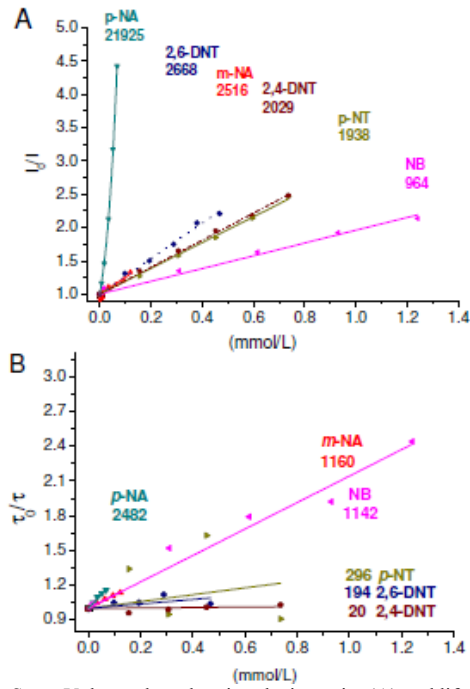


Figure S7. Stern-Volmer plots showing the intensity (A) and lifetime (B) dependence of the monomer emission of QD@Py ($\lambda_{em} = 390$ nm) on analyte concentration.

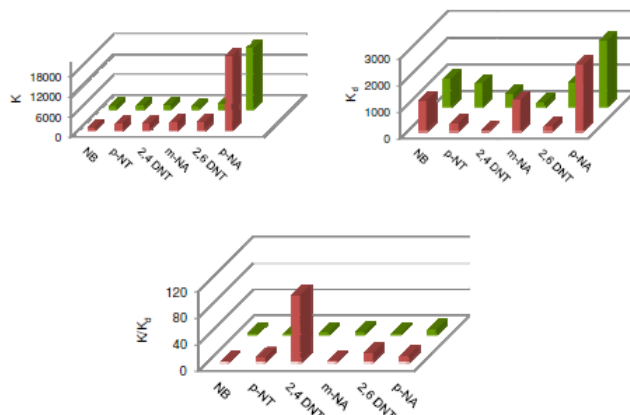


Figure S8. Comparison of the quenching constants K and K_d of QD@Py monomer (in red) and excimer (in green) emission by the nitroanilines and nitrobenzenes obtained from steady-state (A) and time-resolved (B) studies, respectively, as well as comparison of the K/K_d ratios for the monomer and the excimer (C)

Experimental Section

Materials: All reagents were commercially available and used as received. The 11-mercaptoundecanol (MU), and 1-pyrenebutanol were purchased from Sigma-Aldrich. Solvents for chromatography (ethyl acetate and hexane) were reagent grade and used without further purification.

Characterization: UV-vis spectra of the samples were recorded using a quartz cuvettes spectrometer in a UV-visible spectrophotometer Agilent 8453E. The average diameter value of the nanoparticles was estimated following the Peng et al.⁶⁸.

Steady-state fluorescence spectra (LPS-220B, motor driver (MD-5020), Brytebox PTI) were measured on a spectrofluorometer PTI, equipped with a lamp power supply and working at room temperature. The Felix 32 Analysis software was used to register the data. The fluorescence quantum yield was calculated by following the procedure of Resch-Genger et al. All the data were acquired using 1cm×1cm path length quartz cuvettes. Since the nitrocompounds, mainly p-nitroaniline, presented absorbance at the excitation wavelength of pyrene ($\lambda_{exc}=337$ nm), pyrene emission intensities associated with the quenching measurements were corrected for inner-filtering effects arising from the absorption of excitation radiation by the quenching species.

⁶⁸ W. William Yu, Lianhua Qu, Wenzhuo Guo, and Xiaogang Peng Chem. Mat., 2003, 15, 2854.

Time-resolved 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 coupled to the high-resolution GL-302 dye laser (dye: 2-(4-biphenyl)-5-phenyl-1,3,4-oxadiazole, PBD, 5×10^{-3} M in toluene/ethanol: 1/1). The kinetic traces were fitted by mono- or biexponential decay functions and reconvolution of the instrument response function. The accuracy of the fits was evaluated by the reduced χ^2 values ($0.8 \leq \chi^2 \leq 1.2$).

Images from the QDs were obtained by high resolution transmission electron microscopy (HRTEM, FEI Tecnai G2 F20) at an accelerating voltage of 200 kV. Samples were prepared by dropping the colloidal solution on a Lacey Formvar/carbon-coated copper grid. The digital analysis of the HRTEM micrographs was done using digital MicrographTM 1.80.70 for GMS by Gatan.

Synthesis of 4-(pyren-4-yl) butyl-11-mercaptoundecanoate: The Py-SH ligand was prepared following an esterification method described in the literature. In brief, 4-(1-pyrenyl)butanol (722 mg, 2.6 mmol) and 11-mercaptoundecanoic acid (574 mg, 2.6 mmol) were dissolved in anhydride toluene (30 mL). A complex of hafnium/THF (2 mg) was added and the mixture was heated for 48 h under azeotropic reflux conditions to remove water through a Soxhlet thimble with 3 Å molecular sieves. In order to quench the reaction, 1 mL of water was added. After solvent removal, the product was purified by column chromatography using hexane:ethyl acetate solvents (9:1). The compound was obtained in 89 % yield.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 1.07-1.20 (m, 12H), 1.23 (t, $J = 7.7$ Hz; 1H), 1.43-1.57 (m, 4H), 1.68-1.93 (m, 4H), 2.21 (t, $J = 7.7$ Hz; 2H), 2.41 (q, $J = 7.0$ Hz; 2H), 3.30 (t, $J = 7.8$ Hz; 2H), 4.08 (t, $J = 6.3$ Hz; 2H), 7.76-7.81 (d, $J = 7.8$ Hz; 1H), 7.88-7.96 (m, 3H), 8.00-8.11 (m, 4H), 8.16-8.21 (d, $J = 9.3$ Hz; 1H).

Synthesis of QD@Py: A chloroform solution (25 mL) of QD@TOPO (2.85×10^{-7} mol) and Py-SH (9.62×10^{-4} mol, [thiol]/[QD] = 3375 molar ratio) was heated to reflux under nitrogen atmosphere for 48 h. After almost total solvent evaporation (2 mL) and the addition of methanol (30 mL), the samples were centrifugated at 8000 rpm for 20 min at 25°C and the supernatant was decanted. The nanoparticles (QD@Py) were dissolved in toluene (2 mL) and the purification process was repeated five times in order to eliminate the unreacted ligand. Spectroscopic Measurements: Spectroscopic measurements were performed at room temperature ($T=295$ K) with nitrogen-purged solutions in toluene.



Nitroanilines as Quenchers of Pyrene Fluorescence

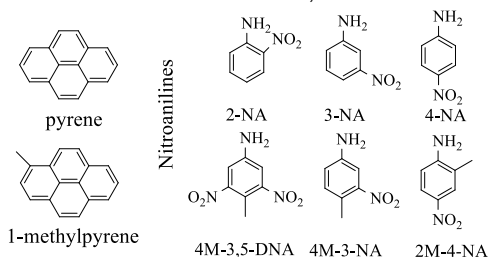
The quenching of pyrene and 1-methylpyrene fluorescence by nitroanilines (NAs), such as 2-, 3-, and 4-nitroaniline (2-NA, 3-NA, and 4-NA, respectively), 4-methyl-3-nitroaniline (4-M-3-NA), 2-methyl-4-nitroaniline (2-M-4-NA), and 4-methyl-3,5-dinitroaniline (4-M-3,5-DNA), are studied in toluene and 1,4-dioxane. Steady-state fluorescence data show the higher efficiency of the 4-NAs as quenchers and fit with a sphere-of-action model. This suggests a 4-NA tendency of being in close proximity to the fluorophore, which could be connected with their high polarity/hyperpolarizability. In addition, emission and excitation spectra evidence the formation of emissive pyrene—NA ground-state complexes in the case of the 4-NAs and, in a minor degree, in the 2-NA. Moreover, time-resolved fluorescence experiments show that increasing amounts of NA decrease the pyrene fluorescence lifetime to a degree that depends on the NA nature and is larger in the less viscous solvent (toluene). Although the NA absorption and the pyrene (Py) emission overlap, we found no evidence of dipole–dipole energy transfer from the pyrene singlet excited state (^1Py) to the NAs; this could be due to the low NA concentration used in these experiments. Transient absorption spectra show that the formation of the pyrene triplet excited state (^3Py) is barely affected by the presence of the NAs in spite of their efficiency in ^1Py quenching, suggesting the involvement of ^1Py —NA exciplexes which, after intersystem crossing decay efficiently into ^3Py .

1. Introduction

Nitroanilines (NAs) are intermediates in the synthesis of dyes, pesticides, and pharmaceuticals and they are reduction products of aromatic explosives. They have been used as fluorescence quenchers of organic chromophores (pyrochlorophyll, benzo[k]fluoranthene, anthracene), biomacromolecules (bovine serum albumin), as well as nanomaterials (cobalt 8-hydroxyquinoline complex-based nanosheets)^[1–4]. In fact, some of these fluorescent systems have been used as isomeric aromatic amine probes^[5–6]. In addition, the capacity of NAs as quenchers has been applied to the direct characterisation of micellar properties of surfactants containing a fluorophore^[7].

Nitroanilines are highly polar molecules belonging to a type of substituted aromatic molecules with a donor-aromatic-acceptor structure. The ground state dipole moment (μ) of 2-nitroaniline (2-NA), 3-nitroaniline (3-NA), and 4-nitroaniline (4-NA) is ca. 4.7, 5.7, and 7.2 D, respectively^[8–9] in dioxane Table S1. The lowest-energy absorption band of 3-NA, 2-NA, and 4-NA is located at quite dissimilar wavelengths (λ_{max} at 348, 377, and 322 nm, respectively) and exhibits a considerably different molar

absorption coefficient (values of 2200, 4800, and 12600 $M^{-1}cm^{-1}$, respectively, in methylcyclohexane)^[10]. It has been suggested that the quenching of the fluorescence of aromatic compounds by NAs can have a static or dynamic nature and can occur via electron or energy transfer. Moreover, the involvement of transient fluorophore---NA complexes (exciplexes), which decay by electron transfer, intersystem crossing, or internal conversion, has been postulated. On many occasions, the behaviour of isomeric NAs, such as 2-, 3-, and 4-NA, as quenchers has been compared with that of aromatic nitrated explosives which act as electron acceptors, though the relative quenching efficiency of the isomeric NAs did not correlate well with their relative redox potential, which decreases in the order 3-NA > 2-NA > 4-NA, Table S1^[11].



Scheme 1. Structure of the pyrenes and the nitroanilines.

Therefore, a systematic study on the interaction between a well-known and extensively used fluorophore, such as pyrene, and NAs would be of interest to gain insight into their role as quenchers. Pyrene has been widely used as a probe due to i) its absorption (strength) features, ii) its long singlet lifetime (> 100 ns,^[12-13] and the information that can be obtained from its fluorescence emission (I_3/I_1 ratio)^[14-15] and iii) its long-lived triplet excited state (microsecond scale). This chromophore has been used in fluorescent chemosensors that can recognize selectively chemical species in potential analytical applications^[16-18]. In fact, nitrated explosives have been detected by fluorescence quenching of pyrene and related compounds^[19-20].

We report here on the quenching of pyrene and 1-methylpyrene fluorescence by unsubstituted NAs (2-, 3-, and 4-NA), methylnitroanilines (4-methyl-3-nitroaniline, 4M-3-NA, and 2-methyl-4-nitroaniline, 2M-4-NA), and a dinitroaniline (4-methyl-3,5-dinitroaniline, 4M-3,5-DNA) in toluene and 1,4-dioxane (Scheme 1). Steady-state fluorescence data revealed positive deviation from linearity in the Stern-Volmer (SV) plots for some NAs. Time-resolved absorption and fluorescence studies were used to gain insight into the quenching mechanism and the species involved in this process. These studies show the tendency of NAs to establish specific interactions with the pyrene singlet excited state and, depending on their structure, to be adjacent to the fluorophore at the ground state, some forming a ground state complex.

2. Results and Discussion

2.1. Steady-state absorption and fluorescence studies

Comparison of pyrene and methylpyrene (31 and 37 μM , respectively) absorption spectra with that of each of the unsubstituted NAs (40 μM) and the corresponding pyrene/NA mixture was registered in both toluene (see Figure 1) and dioxanes (Figure not shown). The absorption spectrum of each mixture was a simple addition of the spectra of the components, i.e. the NAs and the pyrenes. The overlap between the pyrene absorption and that of the NA was considerable in the case of the 4-NAs.

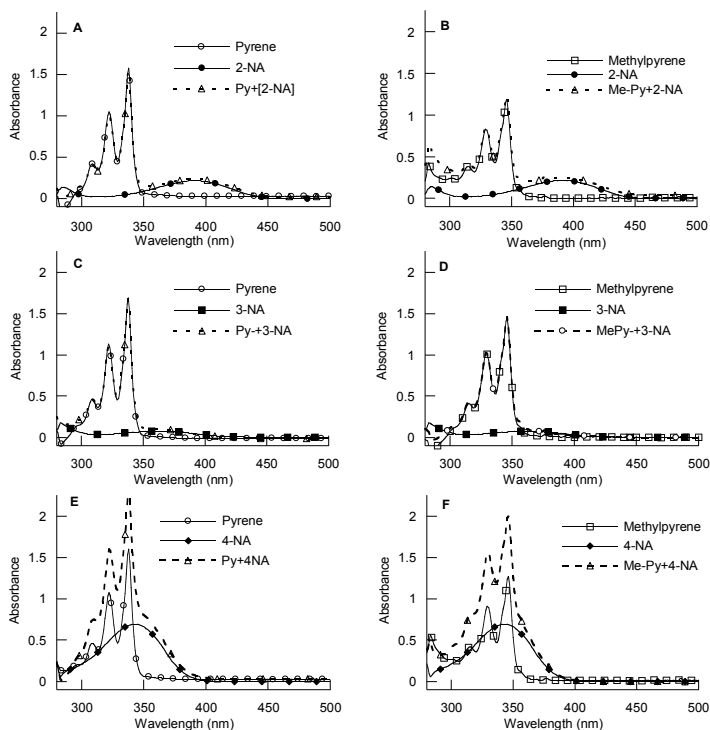


Figure 1. A–C) Absorption spectra of toluene solutions of pyrene (31 mm), NA (40 mm), and a pyrene/NA mixture (31 mm/40 mm), and spectrum obtained by addition of the NA and pyrene spectra. B–F) Absorption spectra of toluene solutions of 1-methylpyrene (37 mm), NA (40 mm), and a methylpyrene/NA mixture (37 mm/40 mm), and spectrum obtained by addition of the NA and methylpyrene spectra. The names of the NA isomer and the pyrene derivative are depicted on each graph.

Steady-state fluorescence studies showed that the NAs are strong quenchers of the pyrene fluorescence emission. Figure 2 shows the corrected emission spectra of deaerated toluene solutions of pyrene and 1-methylpyrene (pyrene: 31 μM , $\lambda_{\text{exc}} = 337 \text{ nm}$; 1-methylpyrene: 37 μM , $\lambda_{\text{exc}} = 345 \text{ nm}$) in the presence of increasing amounts, up to 40 μM , of 2-, 3-, and 4-NA, corrected by the quencher absorbance at the excitation wavelength (for details of the inner filtering corrections see the Supporting Information). With regards to the substituted NAs, their absorption and emission spectra in toluene are shown in Figures S1 and S2 of the Supporting Information.

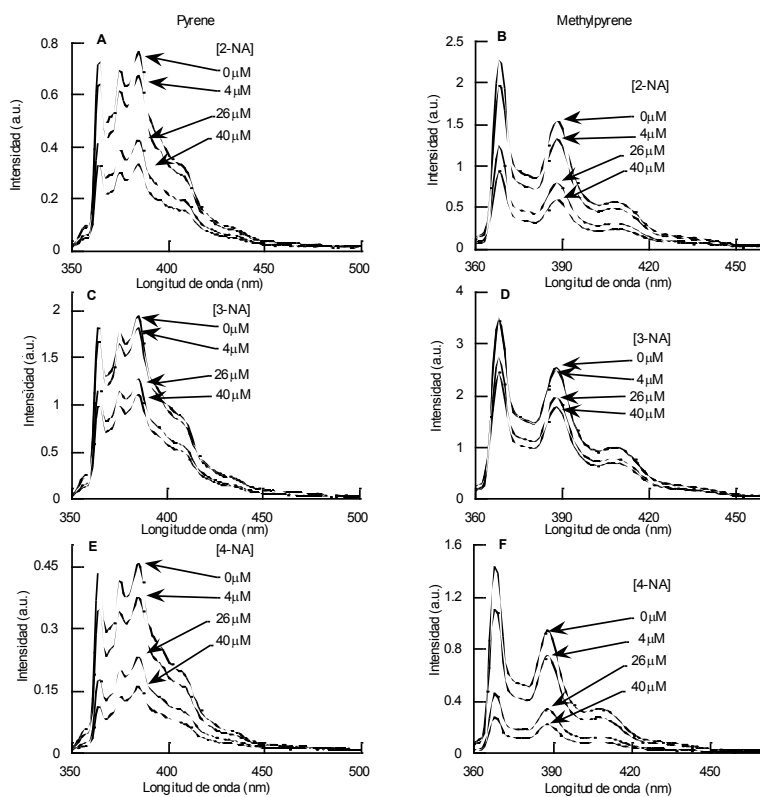


Figure 2. A–E) Emission spectra ($\lambda_{\text{exc}}=337 \text{ nm}$) of deaerated toluene solutions of pyrene (31 μM) in the presence of increasing amounts of NA (up to 40 μM). B–F) Emission spectra ($\lambda_{\text{exc}}=345 \text{ nm}$) of deaerated toluene solutions of methylpyrene (37 μM) in the presence of increasing amounts of NA (up to 40 μM). The structure of the NA isomer is depicted on each graph. The emission spectra were corrected by the quencher absorbance at the excitation wavelength.

The area under the pyrene emission curve was registered in the presence and in the absence of increasing amounts of NA (I_0 and I , respectively), and the I_0/I ratios were plotted versus the NA concentration [NA]. The I_0/I ratio showed a linear dependence on [3-NA] and an upward dependence on [2-NA] and [4-NA] (Figure 3A, Figure 3C). The behaviour of 2-M-4-NA was similar to that of 4-NA, while that of 4-M-3-NA and 4-M-3,5-DNA was analogous to that of 3-NA (Figures 3A and 3C show the SV plots for pyrene and 1-methylpyrene in toluene; for results in dioxane see Figures S 3A and S3C of the Supporting Information).

Since 2-NA and 4-NAs have considerable absorption in the emission spectral region, the pyrene emission was also registered at a fixed wavelength (pyrene: $\lambda_{em}=364$ nm; 1-methylpyrene: $\lambda_{em}=368$ nm) in the presence and in the absence of increasing amounts of the NA. Then, the emission intensities were corrected by the quencher absorbance at both the excitation and the emission wavelength. Again, the plots of I_0/I ratios versus [NA] showed an upward dependence of the fluorophore emission on the NA concentration (see Figure S4, Supporting Information).

A linear SV relationship can be observed if either static or dynamic quenching occurs, in which case SV Equation (1) can be used to quantify the analyte quenching efficiency:

$$I_0/I = 1 + K [Q] \quad \text{Eq. 1}$$

In this equation, I_0 and I are the emission intensities in the absence and presence of the quencher (Q), respectively; [Q] is the molar concentration of Q; and K is the SV constant which, in the case of static quenching, is the association constant (K_a) between the fluorophore (F) and Q.

If the quenching is dynamic, K is the dynamic quenching constant (K_d). Data of I_0/I versus [3-NA] fitted well to Equation (1), as it did in the other 3-NAs (Figures 3A and 3C in toluene and figures S3A and S3C, Supporting Information, in dioxane), suggesting a predominant static or dynamic quenching. Equation (1) applies for a limited range of small and moderate K_a values, except for a very high [Q] where $[Q] \gg [F]$. This equation for static quenching is a simplification of the general Equation (2) for pure static quenching:

$$I_0/(I_0 - I) = 1/K_a \cdot [Q] + 1/f_f \quad \text{Eq.2}$$

where $(I_0 - I)$ refers to the change in fluorescence intensity on the addition of a Q, f_f refers to the fraction of F fluorescence quenched by Q, and K_a is the binding constant in the F—Q complex. Therefore, it should be taken into account that pure static quenching by complexation could lead to upward curvatures in the SV plots. Therefore, the data of pyrene fluorescence quenching by 2-, and 4-NAs were analysed using Equation (2), but they did

not fit well to pure static quenching. So, the SV plots for these quenchers were subsequently analysed in terms of combined dynamic and static quenching [Eq. (3)], but neither did the data fit well to this model:

$$I_0/I = (1 + K_d [Q]) (1 + K_a [Q]) \quad \text{Eq. 3}$$

Remarkably, the up-curving plots for 2-, and 4-NAs fitted well to the Perrin static quenching model [Eq. (4)]:

$$\ln(I_0/I) = K_{ap} [Q] \quad \text{Eq. 4}$$

where K_{ap} is the apparent static quenching constant (see Figures 3B and 3D in toluene and Figures S3B and S 3D, Supporting Information, in dioxane). In this model, static quenching occurs between randomly distributed fluorophores and quenchers that are located in the proximity (action volume). Fluorophore molecules in contact with Q at the instant of excitation will not fluoresce. At best, they have a non-unit probability of fluorescing if the quenching reaction is not totally efficient. Some of the fluorophore molecules will be quenched in a diffusiondependent manner.

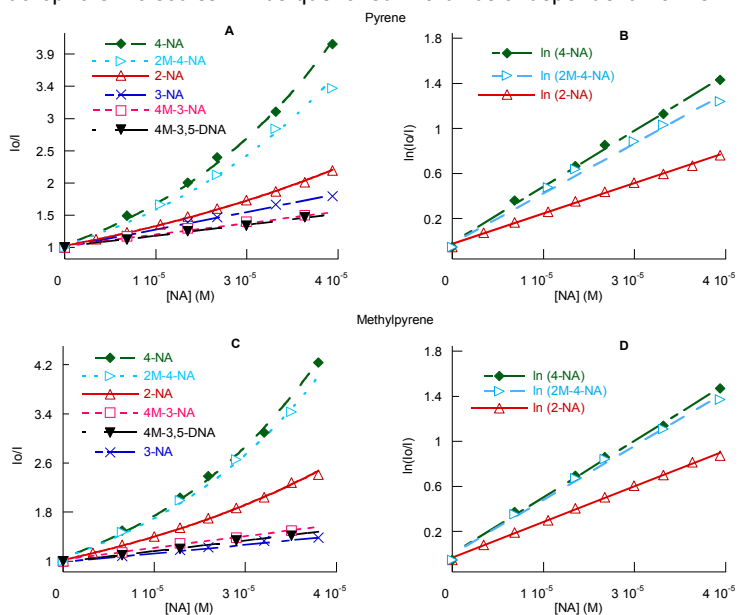


Figure 3. Stern–Volmer graphs of the fluorescence quenching of pyrene (A, $\lambda_{exc}=337$ nm) and methylpyrene (C, $\lambda_{exc}=345$ nm) in deoxygenated toluene solutions at room temperature upon addition of increasing quantities of the nitroaniline. Fitting of the data of 2-, and 4-NAs to the Perrin static model (B: pyrene; D: methylpyrene). The emission intensities were corrected by the quencher absorbance at the excitation wavelength.

Close observation of the shape of the pyrene emission spectrum under increasing amounts of the NAs (up to ca. 40 mM) revealed changes in the I_3/I_1 ratio (I_1 at 364 nm and I_3 at 384 nm) of the pyrene emission bands in some cases (see Figure 4 and Figure S5, Supporting Information, for pyrene results in toluene and dioxane, respectively). This ratio did not change in the presence of increasing amounts of 3-NA, 4-M-3-NA, and 4-M-3,5-DNA, although it decreased slightly in the case of 2-NA but increased significantly in the 4-NAs (4-NA and 2-M-4-NA).

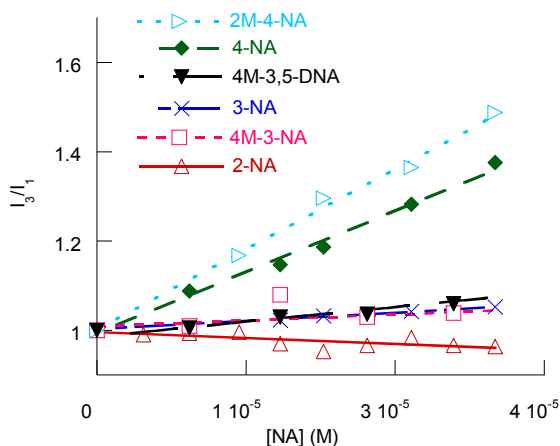


Figure 4. Change in the I_3/I_1 ratio of the pyrene emission bands in deaerated toluene solutions in the presence of increasing amounts of the indicated nitroanilines ($\lambda_{\text{exc}}=337$ nm). The emission intensities were corrected by the quencher absorbance at the excitation wavelength.

Subsequently, the emission spectra of methylpyrene/ 4-NA mixtures at $\lambda_{\text{ex}}=345$ nm were normalised at 364 nm, where the least amount of emission interference occurred. The differential emission spectrum obtained by subtracting the fluorescence spectrum of methylpyrene from that of a methylpyrene/ 4-NA (37 mM/40 mM) mixture showed the features of the new emission extending from 375 to 450 nm and a λ_{max} of about 380 nm, that is, red-shifted compared with that of methylpyrene (see Figure 5 in dioxane). Similar observations were found in the case of pyrene (Figure not shown).

Changes in the I_3/I_1 ratio of the pyrene emission bands could be due to the formation of emissive 1 pyrene—NA exciplexes ($^1\text{Py—NA}$), arising from the interaction of the pyrene singlet excited state with the NA ground state [21–24] (Scheme 2). Alternatively, the species responsible for such

changes could be $^1(\text{Py}-\text{NA})$ complexes obtained after excitation of $\text{Py}-\text{NA}$ ground-state complexes (Scheme 2). Additionally, the NA capacity to affect the local environment of pyrene could be the sole factor that determines the change in the I_3/I_1 ratio of the pyrene emission bands. Excitation spectra were used to elucidate the nature of the emissive species: the $^1(\text{Py}-\text{NA})$ complex would lead to the spectrum of the $\text{Py}-\text{NA}$ ground-state complex; the $^1\text{Py}-\text{NA}$ exciplex would lead to the pyrene spectrum; and similar results would be found if the NAs affect the local environment of pyrene and are responsible for the I_3/I_1 ratio change.

The excitation spectra ($\lambda_{\text{em}}=364$ nm) of methylpyrene/4-NA mixtures in dioxane were normalised at 343 nm. The differential excitation spectrum obtained by subtracting the excitation spectrum of methylpyrene from that of a methylpyrene/4-NA (37 mm/40 mm) mixture showed the features of a new species, whose longest wavelength absorption band was between 250 and 340 nm with a I_{max} at about 320 nm (Figure 5). This finding rules out that the new emission arises from an emissive $^1\text{Py}-4\text{-NA}$ exciplex and suggests the formation of a $\text{Py}-4\text{-NA}$ ground-state complex. Similar analyses were performed to obtain the absorption and emission features of the $\text{Py}-2\text{-NA}$ ground-state complex (not shown).

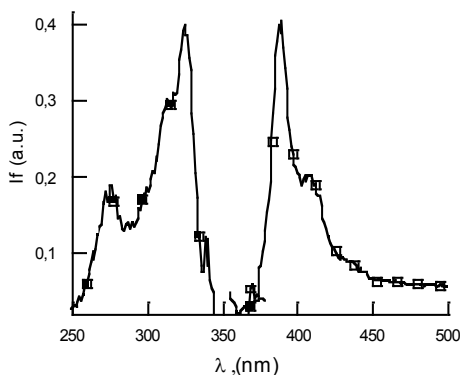


Figure 5. Left: Differential excitation spectra ($\lambda_{\text{em}}=364$ nm) of a mixture of methylpyrene/4-NA (37 mm/40 mm) in deaerated dioxane. Right: Differential emission spectra ($\lambda_{\text{exc}}=345$ nm) of a mixture of methylpyrene/4-NA (37 mm/ 40 mm) in deaerated dioxane.

Though the excitation spectra evidenced the formation of $\text{Py}-\text{NA}$ ground-state complexes, mainly in the case 4-NA, these species were not detected by absorption spectroscopy. This suggests that these species were generated in a very low concentration and/or had a low molar absorption coefficient.

The quenching efficiency by the NAs was slightly influenced by the solvent nature (toluene vs. 1, 4-dioxane) and the pyrene substitution (pyrene vs. 1-methylpyrene), but it was greater for the 4-NAs than for the others (see Figure 6, top, and Figure S6 and Table S2 of the Supporting Information).

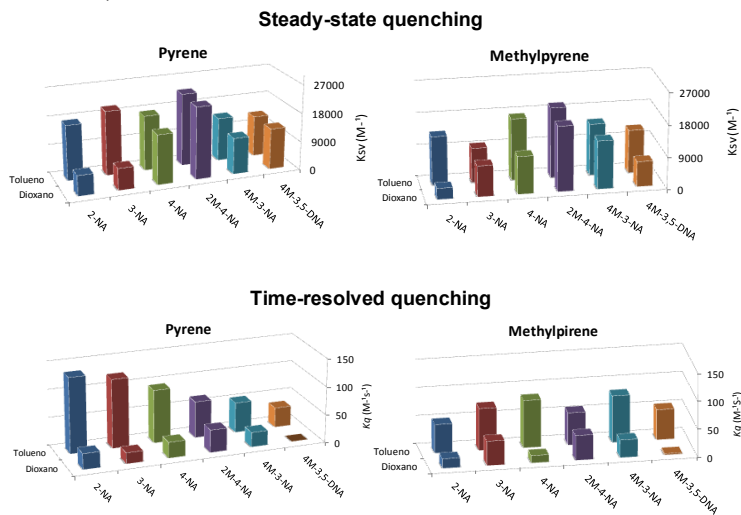


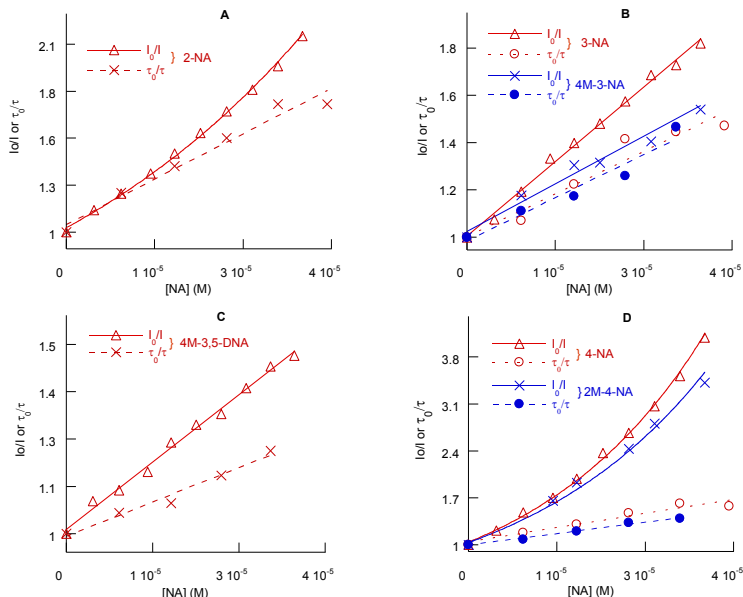
Figure 6. Top: Comparison of the quenching constants of pyrene (left) and 1-methylpyrene (right) emission in toluene and dioxane by NAs; the constants were obtained from the steady-state studies. The emission intensities were corrected by the quencher absorbance at the excitation wavelength. Bottom: Comparison of the quenching rate constants of pyrene (left) and 1-methylpyrene (right) emission by NAs in toluene and dioxane; the rate constants were obtained from the time-resolved studies.

2.2. Time-Resolved Fluorescence Studies

Time-resolved fluorescence measurements were determined to gain insight into the static and/or dynamic nature of pyrene fluorescence quenching by NAs. The data were analysed using Equation (5):

$$\tau_0 / \tau = 1 + K_d [Q] = 1 + k_q \tau_0 [Q] \quad \text{Eq. 5}$$

where k_q is the quenching rate constant, and t and τ_0 are the lifetimes of the excited species in the absence and presence of Q. These studies confirmed that quenching of pyrene fluorescence by 3-NA and 4-M-3-NA was predominantly dynamic (Figure 7B in toluene). The quenching of the pyrene emission by 2-NA also exhibited a considerably dynamic contribution (Figure 7 A). By contrast, it had a considerably static contribution for 4-M-3,5-DNA (Figure 7C). Finally, the high contribution



of apparent static quenching was confirmed for the 4-NAs, that is, 2-M-4-NA and 4-NA (Figure 7D).

Figure 7. Stern–Volmer plots showing a comparison between the intensity (—) and the lifetime (---, λ_{em} at 364 nm) dependence of pyrene emission in toluene on the NA concentration.

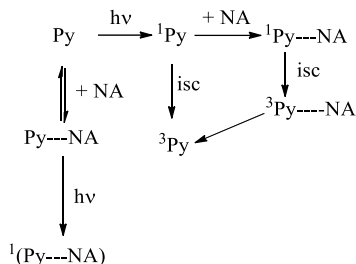
The quenching rate constants showed a drastic dependence on the solvent nature (Figure 6, bottom, and Table S2 of the Supporting Information). Toluene and 1,4-dioxane have similar dipole moments (0.31 and 0.45 Debye, respectively) but differ significantly in their viscosity (ca. 0.5 and 1.1 cP, respectively).^[25] The remarkable decrease in the rate constants in the more viscous dioxane was consistent with the diffusion-dependent nature of such quenching. In addition, the rate constants also showed a considerable dependence on the pyrene substitution. This indicated the occurrence of specific interactions between the fluorophore singlet excited state and the NA.

2.3. Control Studies

The 3-NA could be an acceptor of pyrene singlet energy, since there was a large spectral overlap between its absorption spectrum and that of the pyrene emission (Figure S7, Supporting Information).

This NA exhibited fluorescence in dioxane and toluene at room temperature; thus, its emission spectrum presented a broad band between 450 and 626 nm with λ_{max} at 480 nm (Figure S8, Supporting Information). This spectrum was similar to that reported for 3-NA at low temperatures.^[26, 27] Control studies showed that the emission of 3-NA did not increase in the presence of pyrene (Figure not shown), which indicated that a dipole–dipole singlet–singlet energy-transfer mechanism did not contribute significantly to the pyrene fluorescence quenching. It should be taken into account that for unlinked donor/acceptor pairs, the acceptor concentration must be quite high for the occurrence of significant energy transfer by such mechanism and both the potential energy acceptor [NA] and the donor concentrations were kept below 40 μM in our experiments. Transient absorption spectroscopy could be used to gain information about the consequences of the pyrene fluorescence quenching by NAs on the pyrene triplet (^3Py) yield. Remarkably, laser flash photolysis (Nd:YAG, 355 nm, 10 ns pulse) of the pyrenes showed that the ^3Py absorbance was little affected by the presence of 3-NA, in spite of efficient quenching of ^1Py by this NA (Figure S9, Supporting Information).

This finding suggests an enhanced intersystem crossing to the ^3Py via ^1Py –3-NA exciplexes or triplet–triplet energy transfer from the 3-NA triplet excited state ($^3\text{3-NA}$) to Py (Scheme 2). Laser flash photolysis of 3-NA gave rise to a transient with an absorption band between 360 and 540 nm (λ_{max} ca. 460 nm) and a lifetime of 1.6 ms in toluene (Figure S10, Supporting Information) that could be ascribed to $^3\text{3-NA}$. The absorbance of $^3\text{3-NA}$ was barely affected by the presence of increasing amounts of pyrene, which is consistent with the low-contribution of singlet–singlet energy transfer from ^1Py to 3-NA. Neither did the $^3\text{3-NA}$ lifetime change in the presence of pyrene, which shows the non-occurrence of triplet–triplet energy from $^3\text{3-NA}$ to pyrene.



Scheme 2. Relevant processes in the quenching of pyrene by nitroanilines.

In the case of 4-NA, the $S_1 \rightarrow S_0$ process is highly forbidden compared with intersystem crossing to the triplet.^[10] The intersystem crossing and internal conversion times and the $S_1 \rightarrow T_1$ intersystem crossing efficiency values for 4-NA in dioxane have been estimated as ≤ 0.8 , ≤ 0.5 and ≥ 0.40 ps, respectively.^[28] As expected, we did not detect fluorescence of 4-NA at room temperature, but we registered the 3 4-NA absorption spectrum in dioxane. The lifetime of about 300 ns was similar to that reported in the literature.^[28, 29] However, we failed to monitor clearly the effect of pyrene on the 3 4-NA formation or its lifetime, due to pyrene bleaching and fluorescence. Interestingly, the 3 Py yield was barely affected by the presence of 4-NA and, although triplet–triplet energy from 3 4-NA to pyrene could not be completely discarded, once again, our data pointed to an enhanced intersystem crossing to the 3 Py via 1 Py–4-NA exciplexes.

Finally, we detected neither 12-NA fluorescence at room temperature nor the 3 2-NA absorption spectrum. Once again, the 3 Py absorbance was barely affected by the presence of 2-NA, and this suggests an important contribution of 1 Py–2-NA exciplexes in the formation of 3 Py.

3. Conclusions

The above-mentioned data demonstrate that the efficiency of NAs as quenchers of pyrene fluorescence in low-polar solvents, such as toluene and 1,4-dioxane, correlates better with the NA dipole moment, which decreases in the order: 2-M-4-NA > 4-NA > 3-NA > 4-M-3-NA > 4-M-3,5-DNA > 2-NA,^[9] or even their hyperpolarizability (β), which decreases in the order: 4-NAs > 2-NA > 3-NA,^[30] than with their redox potential, which decreases in the order: 3-NA > 2-NA > 4-NA (see Table S1 of the Supporting Information).

These chromophores possess a strong p-electron delocalization and intramolecular charge transfer stimulated by the presence of electron-donor and electron-acceptor groups. This is particularly relevant for the 4-NAs, whose apparent static quenching of pyrene fluorescence is consistent

with their close proximity to the fluorophore at the ground state. Our data shows that NAs establish strong interactions, not only with the pyrene singlet excited state, but some NAs can also establish interactions with the Py ground state.

Acknowledgements

We thank MICINN (Project CTQ2011-27758 and RyC contract to R.E.G) and GVA (Project GVACOMP/2011/269, Santiago Grisolia grant to C.E.A.) for their support.

- [1] A. Airinei, R. I. Tigoianu, E. Rusu, D. O. Dorohoi, *Digest J. Nanomaterials and Biostructures* 2011, 6, 1265.
- [2] H. Li, Y. Li, *Nanoscale* 2009, 1, 128.
- [3] G. Xiang, C. Tong, H. Lin, *J. Fluoresc.* 2007, 17, 512.
- [4] G. R. Seely, *J. Phys. Chem.* 1969, 73, 125.
- [5] D. Patra, A. K. Mishra, *Sens. Actuators B* 2001, 80, 278.
- [6] H. M. Huang, K. M. Wang, S. S. Huang, L. J. Zhou, D. Li, *Anal. Chim. Acta* 2003, 481, 109.
- [7] M. O. Iwunze, M. Lambert, E. F. Silversmith, *Monatsh. Chem.* 1997, 128, 585.
- [8] V. K. Turchaninov, A. I. Vokin, T. N. Aksamentova, I. G. Krivoruchka, A. M. Shulunova, L. V. Andriyankova, *Russ. J. Gen. Chem.* 2003, 73, 743.
- [9] Y. Xiu-Fen, X. He-Ming, J. Xue-Hai, G. Xue-Dong, *Chin. J. Chem.* 2005, 23, 947.
- [10] O. S. Khalil, S. P. McGlynn, *J. Lumin.* 1975, 11, 185.
- [11] A. Jbarah, R. Holze, *J. Solid State Electrochem.* 2006, 10, 360.
- [12] C. Bohne, E. B. Abuin, J. C. Scaiano, *J. Am. Chem. Soc.* 1990, 112, 4226.
- [13] S. L. Murov, I. Carmichael, G. L. Hug, *Handbook of Photochemistry*, Second ed., New York, 1993.
- [14] K. Kalyanasundaram, J. K. Thomas, *J. Am. Chem. Soc.* 1977, 99, 2039.
- [15] P. Deo, N. Deo, P. Somasundaran, S. Jockusch, N. J. Turro, *J. Phys. Chem. B* 2005, 109, 20714.
- [16] B. Schazmann, N. Alhashimy, D. Diamond, *J. Am. Chem. Soc.* 2006, 128, 8607.
- [17] S. H. Lee, S. H. Kim, S. K. Kim, J. H. Jung, J. S. Kim, *J. Org. Chem.* 2005, 70, 9288.
- [18] K.-S. Focsaneanu, J. C. Scaiano, *Photochem. Photobiol. Sci.* 2005, 4, 817.
- [19] M. S. Meaney, V. L. McGuffin, *Anal. Chim. Acta* 2008, 610, 57.
- [20] W. Chen, N. B. Zuckerman, J. P. Konopelski, S. Chen, *Anal. Chem.* 2010, 82, 461.
- [21] J. H. Lee, E. R. Carraway, M. A. Schlautman, S. Yim, B. E. Herbert, *J. Photochem. Photobiol. A* 2004, 167, 141.
- [22] S. Abraham, R. G. Weiss, *Photochem. Photobiol. Sci.* 2012, DOI: 10.1039/c1pp05312d.
- [23] G. Pistolis, A. Malliaris, *Langmuir* 2002, 18, 246.
- [24] M. C. Cuquerella, S. E. Amrani, M. A. Miranda, J. P. rez-Prieto, *J. Org. Chem.* 2009, 74, 3232.
- [25] A. Goyal, M. Singh, *Ind. J. Chem.* 2007, 46A, 60.
- [26] O. S. Khalil, C. J. Seliskar, S. P. McGlynn, *J. Chem. Phys.* 1973, 58, 1607.
- [27] B. K. M. Szostak, G. Wojcik, J. Lipinski, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 1998, 94, 3241.
- [28] C. L. Thomsen, J. Thøgersen, S. R. Keiding, *J. Phys. Chem. A* 1998, 102, 1062.
- [29] W. Schuddeboom, J. M. Warman, H. A. M. Biemans, E. W. Meijer, *The Journal of Physical Chemistry* 1996, 100, 12369.
- [30] W. Nie, *Adv. Mater.* 1993, 5, 520.



Supporting Information

TABLE OF CONTENTS

Details of Inner filtering corrections

Table S1. Dipole moment, redox potential and hyperpolarizability of the NAs

Table S2. Stern-Volmer constants of the quenching of pyrene and 1-methylpyrene by nitroanilines in toluene and dioxane and quenching rate constants (kq)

Figure S1. Comparative absorption spectra of the substituted NAs, the pyrenes, and the pyrene/NA mixtures in toluene

Figure S2. Emission spectra of the pyrene and methylpyrene in deaerated toluene in the presence and in the absence of the substituted NAs

Figure S3. Stern-Volmer plots of the fluorescence quenching of pyrene and methylpyrene by the NAs in dioxane

Figure S4. Stern-Volmer plots of the fluorescence quenching of pyrene and methylpyrene by the NAs in toluene

Figure S5. Change of the I₃/I₁ ratio of pyrene emission bands in deaerated dioxane solutions in the presence of increasing amounts of the indicated nitroanilines

Figure S6. Comparison of the quenching constants of pyrene and 1-methylpyrene emission in toluene and dioxane by NAs. Data considering both primary and secondary inner filtering effects

Figure S7. Normalised absorption spectrum of the NAs and pyrene emission spectrum

Figure S8. Fluorescence spectrum of 3-NA in toluene

Figure S9. Kinetic decay traces of the methylpyrene triplet in the presence and in the absence of 3-NA

Figure S10. Transient absorption spectra of 3-NA in toluene and dependence of the 3-NA triplet lifetime with pyrene concentration

Inner filter corrections:⁶⁹

Primary inner filtering effect: the correction factor for the excitation (p) was calculated using the following equation

$$\eta_p = \frac{A_{x_0}(1 - 10^{-A_{x_i}})}{A_{x_i}(1 - 10^{-A_{x_0}})}$$

where, A_{x_0} and A_{x_i} are the fluorophore and the quencher absorbances at the excitation wavelength.

Primary and secondary inner filtering effect: the correction factor for the excitation and the emission (η_{ps}) was calculated using the following equation

$$\eta_{ps} = \frac{A_{x_0}A_{y_0}(1 - 10^{-A_{x_i}})(1 - 10^{-A_{y_i}})}{A_{x_i}A_{y_i}(1 - 10^{-A_{x_0}})(1 - 10^{-A_{y_0}})}$$

where, A_{x_0} and A_{x_i} are the fluorophore and the quencher absorbances at the excitation wavelength and A_{y_0} and A_{y_i} are the fluorophore and the quencher absorbances at the emission wavelength

Pyrene/Toluene

[4-NA] (M)	(A_{λ}) _{337nm}	(A_{λ}) _{364nm}	η_{ps}	η_p	I_0/I	(I_0/I) _{364nm}	$\eta_p(I_0/I)$	$\eta_{ps}(I_0/I)$ _{364nm}	$\eta_p(I_0/I)$ _{364nm}
0.0	1.531	0.041	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
4.6E-06	1.691	0.102	0.85	0.91	1.15	1.20	1.05	1.03	1.10
9.1E-06	1.759	0.160	0.77	0.88	1.39	1.50	1.22	1.16	1.32
1.4E-05	1.833	0.217	0.70	0.85	1.57	1.76	1.33	1.23	1.49
1.8E-05	1.903	0.270	0.64	0.82	1.80	2.09	1.48	1.33	1.71
2.2E-05	1.959	0.323	0.59	0.80	2.14	2.50	1.70	1.47	1.99
2.7E-05	2.068	0.417	0.51	0.76	2.37	2.96	1.79	1.51	2.24
3.1E-05	2.109	0.433	0.49	0.74	2.71	3.49	2.01	1.72	2.59
3.5E-05	2.152	0.475	0.46	0.73	3.10	4.02	2.25	1.86	2.93
3.9E-05	2.228	0.544	0.42	0.70	3.58	4.96	2.52	2.09	3.49

⁶⁹ Borissevitch, I. E. J. Luminiscence 1999, 81, 219.

8. ARTÍCULOS PUBLICADOS RELACIONADOS CON LA TESIS

[2M-4NA] (M)	(A _z) _{337nm}	(A _y) _{364nm}	(A _x) _{364nm}	η _{ps}	η _p	l _o /l	(l _o /l) _{364nm}	η _p (l _o /l)	η _{ps} (l _o /l) _{364nm}
0.0	2.040	0.043	1.00	1.00	1.00	1	1.00	1.00	1.00
4.6E-06	2.080	0.088	0.93	0.98	1.15	1.20	1.13	1.12	1.17
9.1E-06	2.170	0.140	0.85	0.94	-	-	-	-	-
1.4E-05	2.220	0.190	0.78	0.92	1.61	1.84	1.49	1.45	1.70
1.8E-05	2.270	0.240	0.73	0.90	1.86	2.24	1.68	1.63	2.02
2.2E-05	2.320	0.300	0.67	0.88	2.03	2.52	1.79	1.69	2.22
2.7E-05	2.380	0.350	0.62	0.86	2.33	3.04	2.01	1.89	2.62
3.1E-05	2.420	0.410	0.58	0.85	2.68	3.54	2.27	2.04	3.00
3.5E-05	2.510	0.460	0.53	0.82	2.90	4.07	2.37	2.16	3.33
3.9E-05	2.500	0.520	0.50	0.82	3.24	4.65	2.66	2.34	3.82

Methylpyrene/Toluene

[4-NA] (M)	(A _z) _{345nm}	(A _y) _{364nm}	η _{ps}	η _p	l _o /l	(l _o /l) _{368nm}	η _p (l _o /l)	η _{ps} (l _o /l) _{368nm}	η _p (l _o /l) _{368nm}
0.0	1.232	0.026	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
4.6E-06	1.438	0.101	0.81	0.88	1.14	1.17	1.00	0.94	1.02
9.1E-06	1.515	0.146	0.73	0.84	1.33	1.37	1.11	1.01	1.15
1.4E-05	1.546	0.141	0.72	0.82	1.54	1.61	1.26	1.17	1.33
1.8E-05	1.618	0.184	0.66	0.79	1.75	1.88	1.38	1.25	1.48
2.2E-05	1.695	0.240	0.60	0.76	2.01	2.18	1.52	1.31	1.65
2.7E-05	1.791	0.305	0.53	0.72	2.31	2.54	1.66	1.35	1.83
3.1E-05	1.828	0.306	0.52	0.71	2.56	2.93	1.80	1.53	2.07
3.5E-05	1.892	0.343	0.49	0.68	2.97	3.48	2.03	1.69	2.37
3.9E-05	1.960	0.409	0.44	0.66	3.44	4.10	2.27	1.81	2.71

[2M-4NA] (M)	(A _z) _{345nm}	(A _y) _{364nm}	η _{ps}	η _p	l _o /l	(l _o /l) _{368nm}	η _p (l _o /l)	η _{ps} (l _o /l) _{368nm}	η _p (l _o /l) _{368nm}
0.0	1.568	0.068	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
4.6E-06	1.624	0.110	0.92	0.97	1.20	1.23	1.17	1.14	1.19
9.1E-06	1.693	0.160	0.84	0.93	1.42	1.47	1.32	1.24	1.37
1.4E-05	1.750	0.210	0.77	0.90	1.62	1.71	1.47	1.32	1.55
1.8E-05	1.813	0.260	0.71	0.88	1.86	2.01	1.63	1.43	1.76
2.2E-05	1.874	0.310	0.66	0.85	2.16	2.38	1.83	1.56	2.02
2.7E-05	1.912	0.340	0.62	0.83	2.44	2.74	2.03	1.71	2.28
3.1E-05	1.981	0.390	0.57	0.81	2.74	3.20	2.21	1.84	2.58
3.5E-05	2.027	0.430	0.54	0.79	3.10	3.66	2.44	1.98	2.88
3.9E-05	2.089	0.480	0.50	0.77	3.46	4.24	2.65	2.12	3.24

Pyrene/Dioxane

[4-NA] (M)	(A ₂) _{337nm}	(A ₂) _{364nm}	η _{ps}	η _p	l ₀ /l	(l ₀ /l) _{364nm}	η _p (l ₀ /l)	η _{ps} (l ₀ /l) _{364nm}	η _p (l ₀ /l) _{364nm}
0.0	1.427	-	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
5.4E-06	1.491	0.002	0.96	0.96	1.16	1.23	1.12	1.18	1.18
1.1E-05	1.559	0.090	0.84	0.93	1.31	1.48	1.22	1.24	1.37
1.6E-05	1.616	0.169	0.74	0.90	1.49	1.75	1.34	1.30	1.57
2.1E-05	1.674	0.248	0.66	0.87	1.69	2.09	1.47	1.38	1.81
2.6E-05	1.735	0.331	0.59	0.84	1.91	2.54	1.60	1.49	2.13
3.1E-05	1.801	0.415	0.52	0.81	2.16	3.05	1.75	1.59	2.47
3.6E-05	1.844	0.487	0.48	0.79	2.45	3.67	1.94	1.75	2.91
4.1E-05	1.901	0.562	0.43	0.77	2.74	4.28	2.11	1.85	3.29
4.5E-05	1.970	0.644	0.39	0.74	3.22	5.29	2.40	2.06	3.94

[2M-4NA] (M)	(A ₂) _{337nm}	(A ₂) _{364nm}	(A ₂) _{364nm}	η _{ps}	η _p	l ₀ /l	(l ₀ /l) _{364nm}	η _p (l ₀ /l)	η _{ps} (l ₀ /l) _{364nm}
0.0	1.561	-	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
3.6E-06	1.595	0.001	0.98	0.98	1.08	1.14	1.06	1.12	1.12
7.2E-06	1.660	0.017	0.93	0.95	1.20	1.34	1.14	1.24	1.27
1.1E-05	1.703	0.053	0.87	0.92	1.33	1.56	1.23	1.35	1.44
1.4E-05	1.752	0.123	0.78	0.90	1.47	1.81	1.32	1.42	1.62
1.9E-05	1.807	0.217	0.69	0.87	1.68	2.22	1.47	1.53	1.94
2.3E-05	1.858	0.303	0.61	0.85	1.97	2.76	1.68	1.70	2.35
2.8E-05	1.905	0.386	0.55	0.83	2.16	3.16	1.80	1.75	2.63
3.0E-05	1.948	0.456	0.50	0.81	2.52	4.02	2.06	2.03	3.27
3.3E-05	2.033	0.550	0.44	0.78	2.81	4.72	2.20	2.10	3.69

Methylpyrene/Dioxane

[4-NA] (M)	(A ₂) _{345nm}	(A ₂) _{364nm}	η _{ps}	η _p	l ₀ /l	(l ₀ /l) _{368nm}	η _p (l ₀ /l)	η _{ps} (l ₀ /l) _{368nm}	η _p (l ₀ /l) _{368nm}
0.0	1.418	0.001	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
5.4E-06	1.492	0.075	0.88	0.96	1.18	1.23	1.13	1.08	1.17
1.1E-05	1.563	0.076	0.84	0.92	1.30	1.38	1.19	1.16	1.27
1.6E-05	1.637	0.144	0.75	0.88	1.38	1.54	1.21	1.15	1.35
2.1E-05	1.707	0.219	0.67	0.85	1.62	1.86	1.37	1.24	1.58
2.6E-05	1.779	0.290	0.60	0.82	1.75	2.11	1.42	1.25	1.72
3.1E-05	1.843	0.355	0.54	0.79	1.99	2.51	1.57	1.35	1.98
3.6E-05	1.908	0.433	0.48	0.76	2.34	3.09	1.79	1.49	2.35
4.1E-05	1.982	0.502	0.44	0.74	2.61	3.60	1.92	1.57	2.65

8. ARTÍCULOS PUBLICADOS RELACIONADOS CON LA TESIS

[2M-4NA] (M)	(A ₂) _{345nm}	(A ₂) _{364nm}	η_{ps}	η_p	I ₀ I	(I ₀ /I) 368nm	η_p (I ₀ /I)	$\eta_{ps}(I_0/I)$ _{368nm}	$\eta_p(I_0/I)$ _{368nm}
0.0	1.560	0.044	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
3.6E-06	1.610	0.103	0.91	0.97	1.11	1.13	1.08	1.03	1.10
7.2E-06	1.670	0.229	0.77	0.94	1.25	1.32	1.18	1.01	1.24
1.1E-05	1.720	0.243	0.74	0.91	1.46	1.60	1.34	1.18	1.46
1.4E-05	1.770	0.299	0.68	0.89	1.65	1.84	1.47	1.24	1.64
1.9E-05	1.830	0.374	0.61	0.86	1.92	2.25	1.66	1.37	1.95
2.3E-05	1.890	0.444	0.55	0.84	2.15	2.59	1.80	1.43	2.17
2.8E-05	1.930	0.517	0.50	0.82	2.48	3.12	2.04	1.58	2.57
3.0E-05	2.010	0.600	0.45	0.79	2.87	3.84	2.27	1.73	3.04
3.3E-05	2.060	0.679	0.41	0.77	3.28	4.67	2.53	1.92	3.60
3.6E-05	2.130	0.754	0.37	0.75	3.87	5.75	2.89	2.15	4.30

Table S1. Dipole moment (μ), redox potential (E_{red}), and hyperpolarizability (β) of the NAs

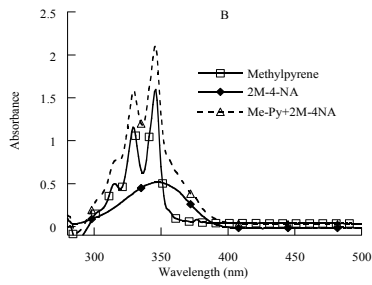
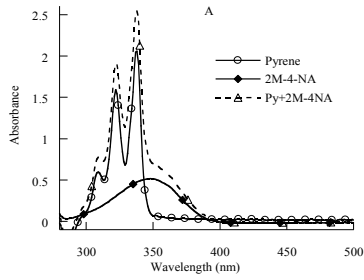
Analyte	μ (D)	E_{red} (V) ^a	β [10^{-30} esu]
2M-4-NA	7.2941	--	42
4-NA	7.1753	-0.923	34.5
2-NA	4.726	-0.882	10
3-NA	5.6762	-0.875	6
4M-3-NA	5.254	--	--
4M-3,5-DNA	4.991	--	--

^aCyclic voltammograms recorded with a platinum electrode in a neutral electrolyte solution A. A. Jbarah, R. Holze, *J Solid State Electrochem* (2006) **10**: 360–372.

Table S2. Stern Volmer constants (K_a association constant, K_{ap} apparent static constant) of the quenching of pyrene and 1-methylpyrene by nitroanilines in toluene and dioxane, obtained from steady-state measurements, and quenching rate constants (kq), obtained from time-resolved measurements.

Analyte	Fluorophore	Solvent	(K_a or K_{ap}) ^{a,b,c}	(kq (10^9)) ^a	
2-NA	Methylpyrene	Dioxane	8196	17.1	
		Toluene	3129*		
		Toluene	23374 13554*	50.9	
	Pyrene	Dioxane	11204	28.1	
		Toluene	6383*		
		Toluene	20150 17376*	134.9	
3-NA	Methylpyrene	Dioxane	8631	43.5	
		Toluene	9613	74.6	
	Pyrene	Dioxane	6858	19.6	
		Toluene	20306	122.7	
	4-NA	Methylpyrene	Dioxane	15343	13.10
			Toluene	10554*	
Toluene			19546 17222*	84.1	
Pyrene		Dioxane	18595	28.2	
		Toluene	15637*		
		Toluene	22825 17384*	94.4	
2M-4-NA	Methylpyrene	Dioxane	26735	44.0	
		Toluene	18262*		
		Toluene	25902 19678*	57.4	
	Pyrene	Dioxane	22554	40.1	
		Toluene	22729*		
		Toluene	25776 22925*	64.7	
4M-3-NA	Methylpyrene	Dioxane	13541	31.5	
		Toluene	14428	82.8	
	Pyrene	Dioxane	11450	26.1	
		Toluene	13729	53.6	
	4M-3,5-DNA	Methylpyrene	Dioxane	7056	2.4
			Toluene	12042	53.5
Pyrene		Dioxane	12944	--	
		Toluene	12889	35.3	

^a Constant units: M^{-1} (K), $M^{-1} s^{-1}$ (kq) ^bLinear correlation, r^2 , >0.998, except for K_a in 2-NA (0.994) ^c K corrected on the absorbance at the excitation wavelength (* K corrected on the absorbance at the excitation and emission wavelength); the values were obtained by measuring the pyrene emission at either 365 nm (pyrene) or 368 nm (1-methylpyrene), where the least amount of emission interference occurred.



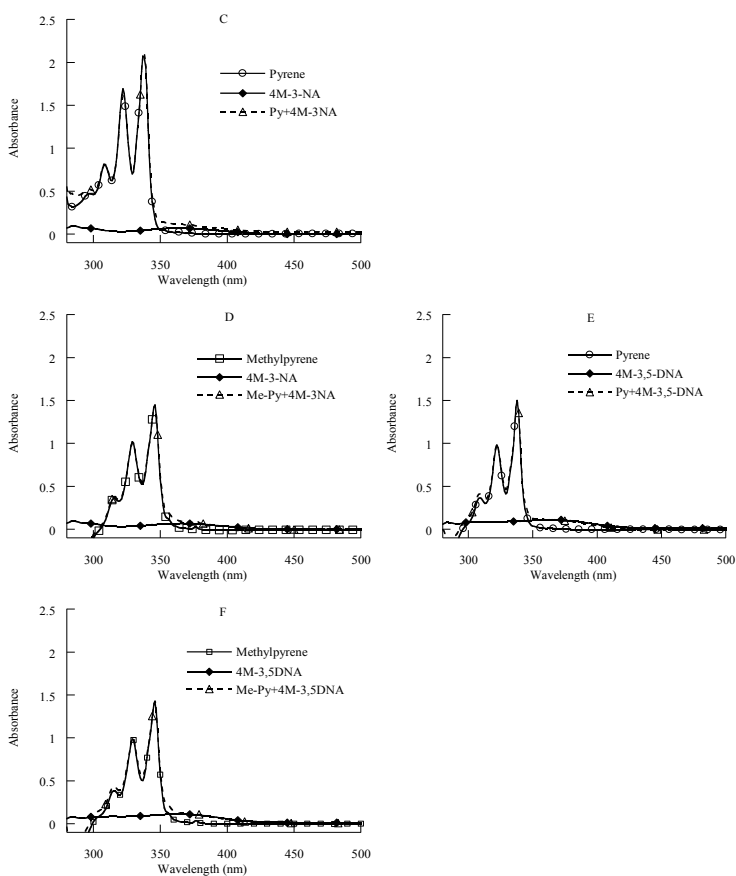


Figure S1. A, C, E: Absorption spectrum of toluene solutions of pyrene (31 μM), the NA (40 μM), pyrene/NA mixture (31 μM /40 μM), and that obtained by addition of the NA and pyrene spectra. B, D, F: Absorption spectra of toluene solutions of 1-methylpyrene (37 μM), the NA (40 μM), methylpyrene/NA mixture (37 μM /40 μM), and that obtained by addition of the NA plus methylpyrene spectra. The name of the NA isomer and the pyrene is depicted on each graph.

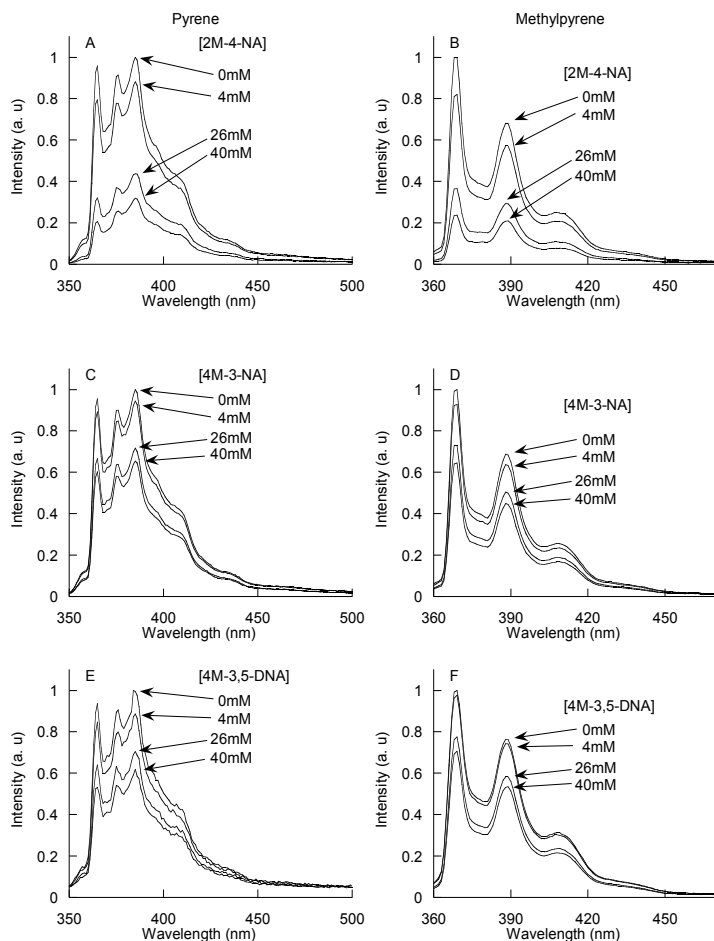


Figure S2. A,C,E: Emission spectra ($\lambda_{\text{exc}} = 337 \text{ nm}$) of deaerated toluene solutions of pyrene ($31 \mu\text{M}$) in the presence of increasing amounts of the NA (up to $40 \mu\text{M}$). B, D, F: Emission spectra ($\lambda_{\text{exc}} = 345 \text{ nm}$) of deaerated toluene solutions of methylpyrene ($37 \mu\text{M}$) in the presence of increasing amounts of the NA (up to $40 \mu\text{M}$). The structure of the quencher absorbance at the excitation wavelength.

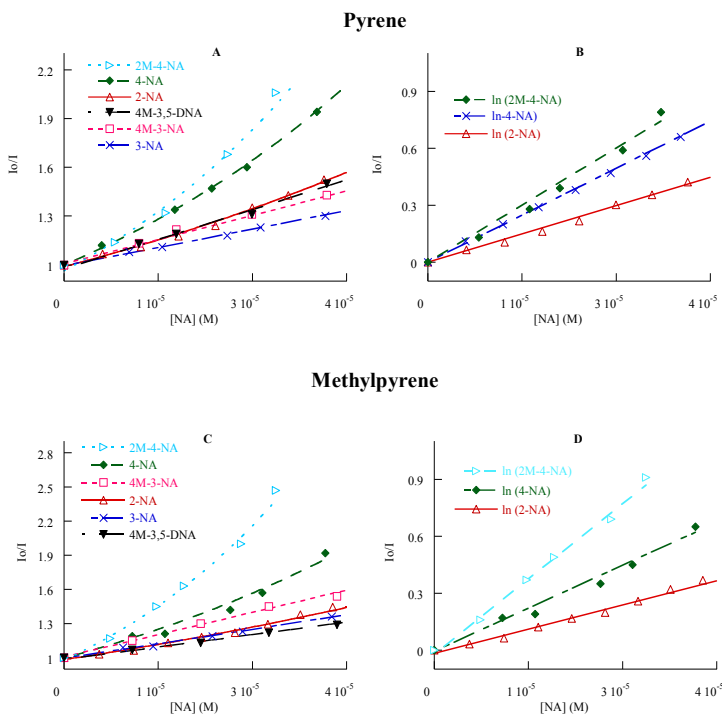


Figure S3. Stern-Volmer plots of the fluorescence quenching of pyrene (A, $\lambda_{\text{exc}} = 337$ nm) and methylpyrene (C, $\lambda_{\text{exc}} = 345$ nm) in deoxygenated dioxane solutions at room temperature, upon addition of increasing quantities of the nitroaniline. Fitting of the data of 2-, and 4-NAs to the Perrin static model (B: pyrene; D: methylpyrene). The emission intensities were corrected by the quencher absorbance at the excitation wavelength.

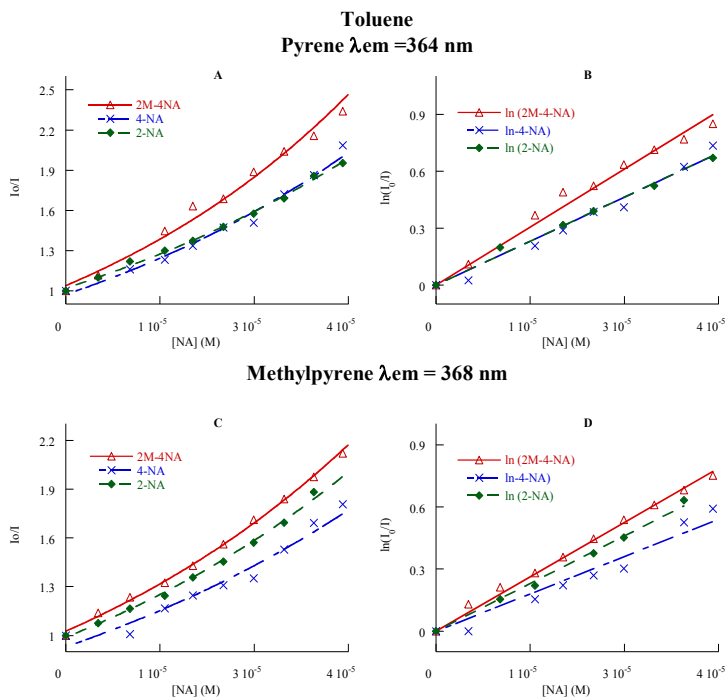


Figure S4. Stern-Volmer graphs of the fluorescence quenching of pyrene (A, $\lambda_{exc} = 337$ nm) and methylpyrene (C, $\lambda_{exc} = 345$ nm) in deoxygenated toluene solutions at room temperature, upon addition of increasing quantities of 2- and 4-NAs. The emission intensities were corrected by the quencher absorbance at the excitation wavelength as well as at the emission wavelength (pyrene: 364 nm; 1-methylpyrene: 368 nm). Fitting of the data of 2-, and 4-NAs to the Perrin static model (B: pyrene; D: methylpyrene).

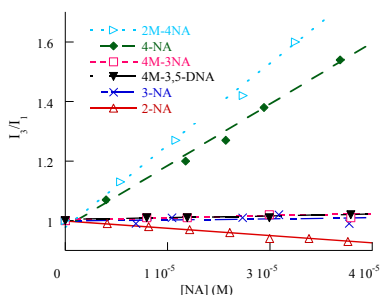


Figure S5. Change of the I_3/I_1 ratio of pyrene emission bands in deaerated dioxane solutions in the presence of increasing amounts of the indicated nitroanilines ($\lambda_{exc} = 337$

nm). The emission spectra were corrected by the quencher absorbance at the excitation wavelength.

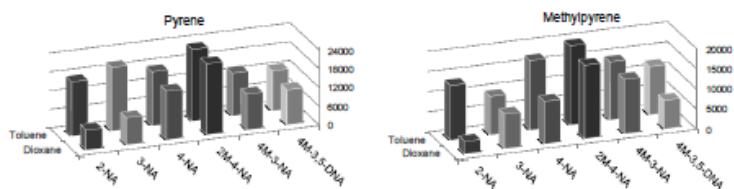


Figure S6. Comparison of the quenching constants of pyrene (left) and 1-methylpyrene (right) emission in toluene and dioxane by NAs; the constants were obtained from the steady-state studies. Data considering both primary and secondary inner filtering effects.

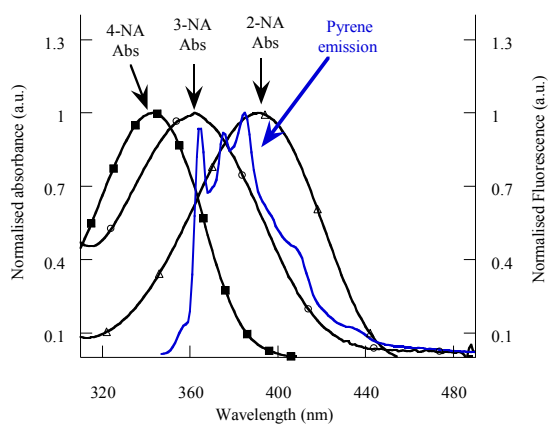


Figure S7. Normalised absorption spectrum of the NAs and pyrene emission spectrum

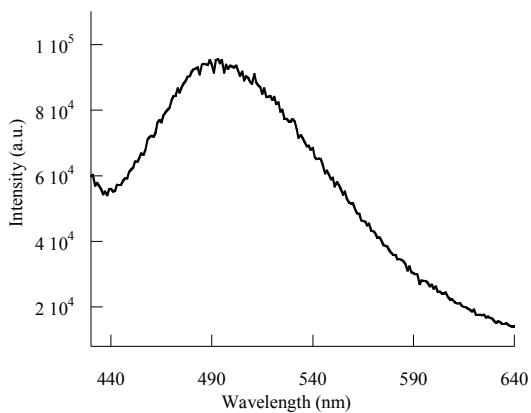


Figure S8. Fluorescence spectrum ($\lambda_{\text{exc}}=365\text{nm}$) of 3-NA ($40 \mu\text{M}$) in deaerated toluene.

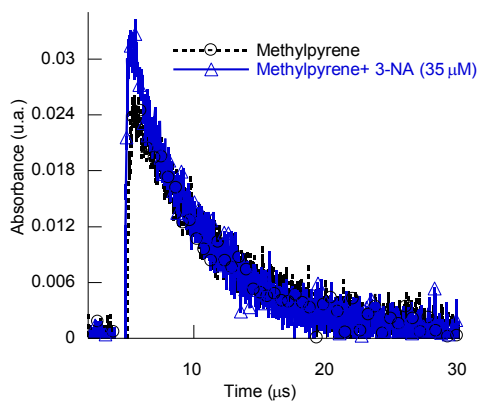


Figure S9. Kinetic decay traces of the methylpyrene triplet in the presence and in the absence of 3-NA monitored at 420nm.

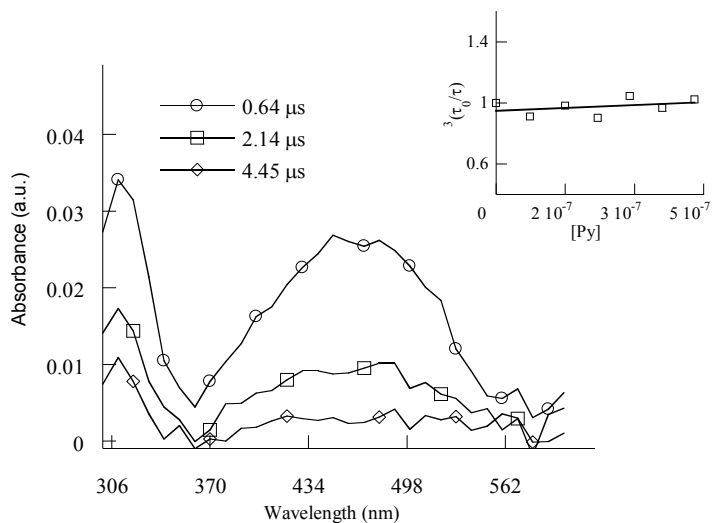


Figure: S10. Transient absorption spectra of 3-NA in deaerated toluene. Inset: dependence of the 3-NA triplet lifetime with pyrene concentration ($\lambda_{exc}=355$ nm).

Three independent channel anohybrids as fluorescent probes

A properly designed pyrene-capped CdSe/ZnS nanohybrid can act as a three-channel fluorescent sensor due to the independent emission of the pyrene monomer and excimer as well as that of the nanoparticle. As proof of principle, it was tested for a simple and rapid quantification of TNT in the presence of interferents of the same chemical family.

Introduction

Fluorescence sensing is a powerful strategy to detect molecular targets and it is consequently a widely-used technique in chemistry, biology, and medicine.^{1–3} Though a huge number of fluorescent probes have been developed, most of them exhibit fluorescence signal variations in only one channel.⁴ Multichannel based probes can be highly useful for (i) reducing errors due to false positives and interferents, (ii) providing simultaneous detection, and even quantification, of analytes of a dissimilar structure and/or closely related structures, among other applications. There are considerably fewer examples of two-channel probes,^{5,6} and probes able to detect chemical species in three different emissive channels (single excitation/triple channel emission) are uncommon.^{7,8} Moreover, if those channels were independent channels it would be even more advantageous, but to our knowledge this has not been reported yet. In fact, we recently reported the preparation of pyrenecapped core-shell CdSe/ZnS quantum dots (CS@Py) which present three fluorescent channels: (i) the Py monomer (M^*), (ii) the Py excimer (E^*),^{9–11} and (iii) the nanoparticle excited state (CS^*).¹² These nanohybrids were tested as sensors of the oxygen concentration, $[O_2]$, in organic solvents. However, the channels failed to give a linear response to the analyte due to the fact that the solubility of $[O_2]$ in the solvents is high, as well as being due to the formation of complexes between the analyte and the pyrene channel.

We then realised that CS@Py (Fig. 1) could be suitable as three independent channel fluorescent probes provided that there was a low concentration of the analyte, which is usually the aim of a sensor, i.e., to be able to detect the least amount of the analyte as possible. As proof of concept, we chose nitroaromatic compounds (NACs, Fig. 1) as highly challenging test of the performance of these nanohybrids, since (i) NACs quench both the M^* and E^* of Py-capped NPs and the decrease of E^* emission hardly reflects the quenching of M^* , i.e., the E^* and M^* emissive channels would behave as

RSC Advances

independent channels;¹³ (ii) CS@Py are highly emissive and the size of the core of the CS avoids the overlap between its specific emission and those of M* and E*; (iii) trinitrotoluene (TNT) is a relevant explosive and other NACs, in particular 2,4-, and 2,6-dinitrotoluene (2,4-DNT, and 2,6-DNT, respectively) are TNT by-products.

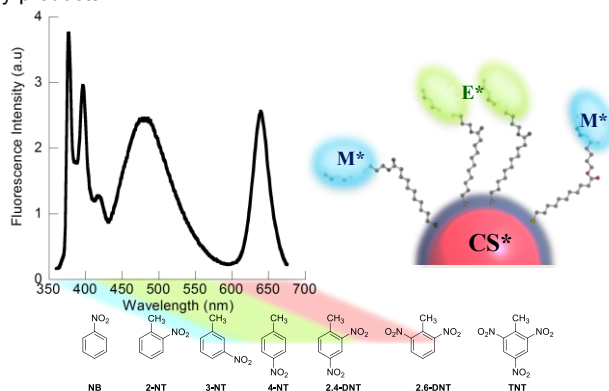


Fig. 1 Fluorescence spectrum (exc λ 340 nm) of CS@Py (64 nM) in THF. Schematic picture of the three emissive species: M* (397 nm), E* (480 nm), and CS* (640 nm) of CS@Py. Structure of the tested nitroaromatic compounds (NACs).

Different techniques have been used to detect NACs, such as gas chromatography coupled with mass spectroscopy, X-ray imaging, surface enhanced Raman spectroscopy, microfabricated gas chromatography, among others.¹⁴ Fluorescence has proved to be a highly competitive technique (high sensitivity, simple operation, and uses cost-effective instrumentation).^{15–17} Several materials have been used as fluorescent probes, such as conjugated polymers,¹⁸ self-assembly molecular gels,¹⁹ metal organic frameworks,²⁰ and hybrid organic–inorganic materials.²¹

We demonstrate here that CS@Py nanohybrids are unique systems since they can act as probes with three independent fluorescent channels. Thus, NACs (nitrobenzene, NT; 2-nitrotoluene, 2NT; 3-nitrotoluene, 3NT; 4-nitrotoluene, 4NT; 2,4DNT; 2,6DNT and 2,4,6-trinitrotoluene, TNT, Fig. 1) proved to be efficient quenchers, by decreasing the intensity of the three channels independently. As proof of the applicability of this smart nanohybrid, we focussed our efforts on developing a simple, rapid, and inexpensive method for quantifying TNT in binary and ternary mixtures of NACs, based on their different capacities as quenchers of the fluorescence intensity of the three emissive species (M*, E*, and CS*).

RSC Advances

Experimental section

Reagents and techniques

All reagents were commercially available and used as received. The 11-mercaptoundecanol (MU), and 1-pyrenebutanol were purchased from Sigma-Aldrich. Toluene and tetrahydrofuran of HPLC grade were purchased from Scharlau. The core shell (CS) capped with long-chain primary amine was purchased from Ocean Nanotech LLC. The NCs were purchased from Sigma-Aldrich, except for TNT, which was synthesized.

UV-Vis spectra of the samples were recorded using a quartz cuvettes spectrometer in a UV-visible spectrophotometer Agilent 8453E. Steady-state fluorescence spectra (LPS-220B, motor driver MD-5020, Brytebox PTI) were measured on a spectrofluorimeter PTI, equipped with a lamp power supply and working at room temperature. The Felix 32 Analysis software was used to register the data. All the data were acquired using 1 cm x 1 cm path length quartz cuvettes.

Time-resolved 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 mono- or biexponential decay functions and deconvolution of the instrument response function. The accuracy of the fits was evaluated by the reduced χ^2 values ($0.8 < \chi^2 < F1.2$).

CS nanoparticles images were obtained by high-resolution transmission electron microscopy (HRTEM, FEI Tecnai G2 F20) at an accelerating voltage of 200 kV. Samples were prepared by dropping the colloidal solution on a Lacey Formvar/carboncoated copper grid. The digital analysis of the HRTEM micrographs was done using digital Micrograph™ 1.80.70 for GMS by GATAN.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) spectra were recorded on 300 MHz spectrometer (Bruker AVANCE DRX 300). The samples were dissolved in deuterated chloroform.

Synthesis of the nanohybrid CS@Py

The CS@Py was synthesized following the previous described methodology.¹² The CS@Py concentration of a sample was determined by first estimating the average diameter value of the CdSe core (exciton peak at 622 nm) and then estimating the extinction coefficient at the exciton peak wavelength (see Peng et al.²² equation). The number of Py units on each nanoparticle was estimated by firstly determining the extinction coefficient of Py in THF ($= 13193 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). The absorbance at 335 nm of a solution of CS@Py and that of CS, both at the same nanoparticle concentration, were registered. The difference between these absorbances was attributed to Py ($A_{\text{Py}}(335 \text{ nm}) =$

$A_{CS@Py} - A_{CS}$), thus allowing the estimation of Py concentration $[Py] = A_{Py}(335 \text{ nm}) / \epsilon b$, and, eventually, the ratio of Py units per nanoparticle.

The quantification of the organic capping of the hybrid nanoparticles (CS@Py) has been carried out by combining the absorption and the NMR techniques. The $^1\text{H-NMR}$ spectra of CS@Py and the thiol ligand (Py-SH) were recorded in deuterated chloroform and they were compared with that of CS in the same solvent. The more significant signals of the aliphatic chain of the Py-SH and that of the amine of CS were used to identify and quantify the total Py-SH (bonded and free) and the remaining amine on the CS@Py nanohybrid.

Results and discussion

Properties of the fluorescent probe

The nanohybrid¹² was prepared from a commercial aminecapped CS ($\lambda_{\text{abs}} = 622 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 640 \text{ nm}$, with a total and core diameter of $8.7 \pm 1.5 \text{ nm}$ and 5.8 nm , respectively, and with a fluorescence quantum yield, Φ_f , of 0.38), by means of a ligand exchange strategy with a pyrene derivative possessing a long flexible chain ending in a thiol group to anchor the CS surface (Py-SH).²³ Transmission electron microscopy (TEM) images of CS@Py demonstrated that the CS crystallinity and size remained after functionalization (Fig. S1†). The molar extinction coefficient (ϵ) of the nanoparticle was estimated as $6.14 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.²² The photophysical properties of the CS@Py are summarised in Table S1 in ESI.†

The absorption spectrum of CS@Py in tetrahydrofuran (THF) showed a small exciton peak at 622 nm and well-resolved peaks below 350 nm corresponding to the Py units (Fig. 2).

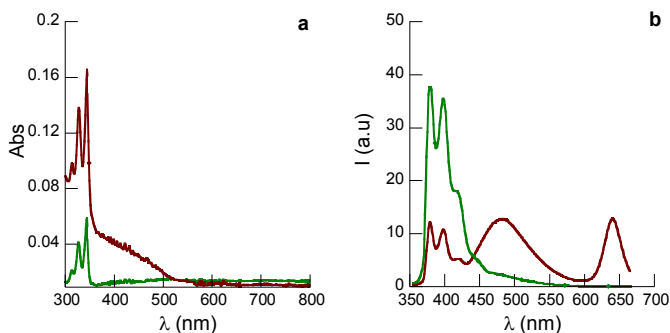


Fig. 2 (a) absorption and (b) fluorescence ($\lambda_{\text{exc}} = 340 \text{ nm}$) spectra of CS@Py (5 nM, garnet) and PySH (1 mM, in green) in THF; both with the same pyrene concentration (1 mM).

The average number of Py moieties was calculated to be ca. 200 per nanoparticle taking into account the average size of the nanoparticles. Absorption and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy were used to determine the Py number. Thus, the pyrene contribution to the absorbance at

335 nm of a THF solution of CS@Py was estimated by using the molar absorption coefficient of pyrene ($13193 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ in THF). The $^1\text{H-NMR}$ spectrum of CS@Py mainly showed broad peaks due to the restricted motion of the surface ligands. Quantification of the components revealed that the ligand exchange was not complete (88:12 thiol/amine molar ratio) and that free PySH was less than 1%.

The fluorescence spectrum of CS@Py (Fig. 2) presented the emission bands corresponding to the three emissive species (i) M^* at $\sim 370 \text{ nm}$, 397 nm , and $\sim 420 \text{ nm}$, (ii) E^* centred at 480 nm , and (iii) CS^* at 640 nm . The high local concentration of Py at the CS periphery enabled formation of E^* in an otherwise diluted solution (mM concentration). It should be taken into account that E^* is not efficiently formed at mM concentrations (Fig. 2), therefore the E^* formation is due to a synergetic effect between the organic capping and the nanoparticle.²⁴ The CS@Py nanohybrid exhibited a lower Φ_F than the amine-capped CS (21% vs. 38%).

Time-resolved measurements showed that the average fluorescence lifetime (τ_{av}) of the CS remained almost the same after Py-functionalization. Therefore, in view of eqn (1), where k_r is the radiative constant, the functionalization caused a decrease in k_r of ca. 40% (from $9.80 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ to $5.95 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$); this is consistent with the reported effect of sulphur atoms slowing down the radiative process.²⁵ By using eqn (2), the non-radiative (k_{nr}) constant was calculated, and showed that the ligand exchange caused an increase in k_{nr} (from $16.2 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ to $22.4 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$). This behaviour is consistent with the alteration of the QD surface caused by the thiolate binding,²⁶ thus making the electron density locate at shallow trap states close to the conduction band edge.²⁵ With regard to the pyrene species of CS@Py, M^* exhibited two components at 87.4 and 15.9 ns (Fig. S2†). The short decay lifetime coincided with the growth lifetime of E^* (17.3 ns) as has been previously observed for CdSe@Py.¹³ Comparatively, under the same conditions, pyrene exhibits one component with a lifetime of 94.7 ns.

$$\Phi_F = \tau_{av} \times k_r \quad \text{Equation 1}$$

$$\tau_{av} = \frac{1}{k_r + k_{nr}} \quad \text{Equation 2}$$

Fig. 3 shows the evolution of the CS@Py fluorescence spectrum recorded at different times after excitation at 337 nm (nitrogen laser). The highest intensity of E^* was found after 35 ns of the laser pulse.

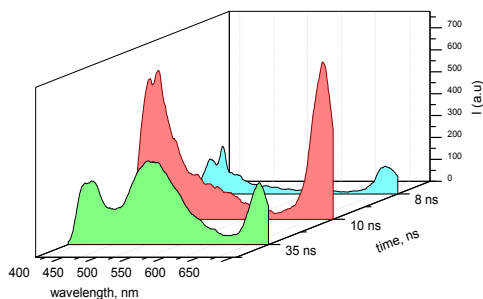


Fig. 3 Fluorescence spectra of CS@Py in THF at different times (8, 10 and 35 ns) after the laser pulse (337 nm).

Steady-state and time-resolved fluorescence quenching studies

The variation of the fluorescence intensity and lifetime in the presence of increasing amounts of the NAC was recorded for the three emissive channels to determine the nature and efficiency of the quenching processes. The NAC concentration was kept under 0.25 mM and the emission intensities were corrected for the primary and secondary filter effects due to the absorbance of the NAC at the excitation and emission wavelengths, respectively. See Fig. 4 for TNT analyte and Fig. S3 and S4† for the other compounds.^{27,28}

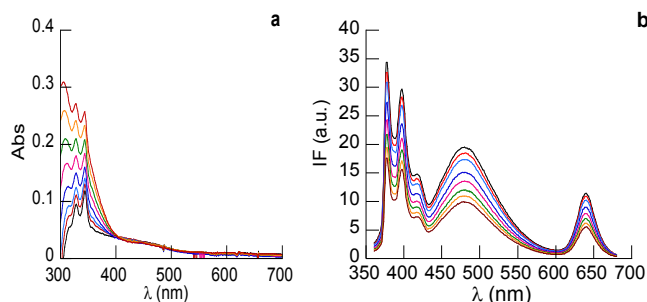


Fig. 4 (a) absorption and (b) emission spectra ($\lambda_{exc} = 340$ nm) of CS@Py (5 nM) at different concentration of the NAC (0–0.25 mM) in THF, under N_2 atmosphere.

Both the emission intensity and lifetime of the three channels showed a linear dependence on the NAC concentration (see Fig. 5 for TNT and Fig. S6† for all the NACs). The corresponding quenching constants (K_{sv} and K_d) were calculated by using Stern–Volmer eqn (3) and (4).

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_{SV} \cdot [Q] \quad \text{Equation 3}$$

$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 + K_d \cdot [Q] \quad \text{Equation 4}$$

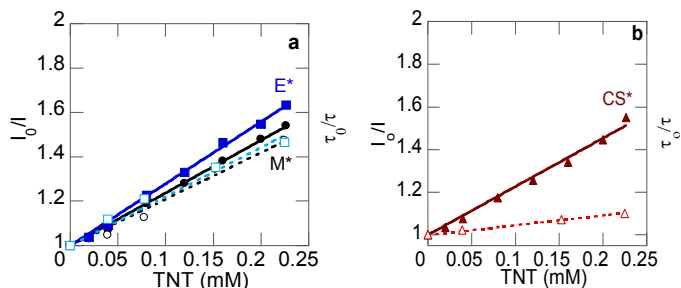


Fig. 5 Stern–Volmer plots showing the intensity (—), and lifetime (---) dependence of (a) M^* and E^* and (b) CS^* emission of $CS@Py$ (5 nM in THF, $\lambda_{exc} = 340$ nm) on TNT concentration.

The quenching of the Py species is mainly of a dynamic nature as shows the similarity between the values of K_{sv} and K_d (see Table 1 for K_{sv} and Table S2† for K_d). However, in the case of the CS, the quenching is mainly static for all the NACs, but in NB the quenching is exclusively static. These data are consistent with some NAC encapsulation within the organic capping and therefore close to the CS surface and also near to the Py units. This is another manifestation of the synergetic effect between the organic and inorganic components of the nanoparticle.²⁴

Table 1 Stern–Volmer quenching constants (K_{sv}) of the pyrene monomer, M^* , pyrene excimer, E^* , and nanoparticle excited state (CS^*) in the $CS@Py$ hybrid by the nitroaromatic compounds

	M^*	E^*	CS^*
NB	1197 ± 45 (0.992)	1995 ± 74 (0.992)	753 ± 21 (0.995)
2NT	1572 ± 31 (0.995)	1627 ± 28 (0.996)	1457 ± 23 (0.997)
3NT	2078 ± 50 (0.996)	1804 ± 33 (0.997)	1248 ± 37 (0.993)
4NT	2160 ± 82 (0.994)	2805 ± 76 (0.997)	1049 ± 63 (0.989)
2,4 DNT	1220 ± 53 (0.991)	1306 ± 45 (0.990)	1200 ± 53 (0.991)
2,6 DNT	2848 ± 160 (0.986)	2672 ± 188 (0.980)	1963 ± 60 (0.996)
TNT	2372 ± 32 (0.998)	2786 ± 34 (0.999)	2267 ± 50 (0.995)

K_{sv} units: M^{-1} ; data obtained from the steady-state measurements.

The sensitivity of each individual channel towards the NACs was analysed by using the K_{sv} values. The values decreased in the following order (i) 2,6DNT > TNT > 4NT ~ 3NT > 2NT > 2,4DNT ~ NB for M^* channel; (ii) 4NT ~ TNT ~ 2,6DNT > NB > 3NT > 2NT > 2,4DNT for the E^* channel, and (iii) TNT > 2,6DNT > 2NT > 3NT ~ 2,4DNT > 4NT > NB for the CS^* channel. The limit of detection (LOD) and quantification (LOQ) were calculated using the IUPAC

criteria, based on the sensitivity and three and ten times the blank measurement standard deviation for LOD and LOQ, respectively. The LOD values were under 0.13 ppm, while LOQ values were under 0.32 ppm (Table 2). Consequently, all the NACs were suitable to be quantitatively determined at trace levels.

Table 2 Calculated LOD and LOQ for the determination of the nitroaromatics compounds considered using the three channels CS@Py

Analyte	M*		E*		CS*	
	LOD (ppm)	LOQ (ppm)	LOD (ppm)	LOQ (ppm)	LOD (ppm)	LOQ (ppm)
NB	0.09	0.29	0.04	0.14	0.06	0.21
2 NT	0.07	0.24	0.06	0.19	0.03	0.12
3 NT	0.06	0.18	0.05	0.17	0.04	0.14
4 NT	0.05	0.18	0.03	0.11	0.05	0.15
2,4 DNT	0.13	0.42	0.10	0.32	0.06	0.19
2,6 DNT	0.05	0.18	0.05	0.16	0.04	0.12
TNT	0.08	0.27	0.06	0.19	0.04	0.13

Quantification of TNT in binary and ternary mixtures of NACs

The performance of CS@Py as a three independent channel, fluorescent probes was evaluated for the TNT quantification in binary and ternary mixtures.

The proportional equations approach provided quantitative data about TNT, NB, and 3NT mixtures by using, at least, the same number of independent equations than target analytes. The variation of the fluorescence intensity (I_0/I) in the system and the concentration of the NACs follow, in the steady-state, eqn (5), where K_{NAC} is the Stern–Volmer quenching constant and C_{NAC} is the concentration of each of the NACs in the sample.

$$\frac{I_0}{I} = \sum K_{NAC} \cdot C_{NAC} \quad \text{Equation 5}$$

Table 3 shows the data obtained for TNT/NB and TNT/3NT binary mixtures at 0.5: 1 and 1: 1 molar ratios, respectively, and a TNT concentration of 0.150 mM. The relative error (E%) between the theoretical and calculated TNT concentrations varied from 1.4 to 24.1% depending on the system, the relative concentration of the compounds, and the channels selected for the data treatment. So being confirmed that TNT and NB or mixtures of TNT and 3NT can be accurately analysed based on the proper selection of channels, being

found the best results using M* and CS* channels and E* and CS* channels, respectively.

For TNT quantification in the presence of NB, the use of the monomer channel provided the lowest accuracy errors (1.4 and 2.9% at 0.5: 1 and 1: 1 molar ratios, respectively) as a function of the proportion between these compounds. However, in the presence 3NT, the minimum errors found for TNT quantification were 6.4 and 8.6% using the excimer channel.

Table 3 Quantification of TNT in TNT/NB and TNT/3NT binary mixtures.

	Calculated concentration (mM)			
	$C_{\text{TNT}}/C_{\text{NB}}$ 1:0.5 molar ratio ^a		$C_{\text{TNT}}/C_{\text{NB}}$ 1:1 molar ratio ^b	
	C_{TNT} (E %)	C_{NB} (E %)	C_{TNT} (E %)	C_{NB} (E %)
M*	0.148 (1.4)	0.073 (5.4)	0.145 (2.9)	0.139 (5.8)
E*	0.145 (3.3)	0.070 (8.2)	0.131(11.6)	0.126 (14.6)
CS*	0.148 (1.3)	0.072 (6.6)	0.140 (5.1)	0.128 (13.5)
	Calculated concentration (mM)			
	$C_{\text{TNT}}/C_{\text{3NT}}$ =1:0.5 molar ratio ^a		$C_{\text{TNT}}/C_{\text{3NT}}$ =1:1 molar ratio ^b	
	C_{TNT} (E %)	C_{3NT} (E %)	C_{TNT} (E %)	C_{3NT} (E %)
M*	0.119 (21.1)	0.047 (38.0)	0.112 (24.1)	0.108 (26.7)
E*	0.141(6.4)	0.062 (17.1)	0.161 (8.6)	0.165 (12.0)
CS*	0.131 (12.7)	0.044 (41.4)	0.138 (6.4)	0.132 (10.0)

a Theoretical concentration: 0.150 mM (TNT) and 0.077 mM (NB and 3NT). b Theoretical concentration: 0.148 mM for TNT, NB, and 3NT. The E% is the ratio of the absolute error of the measurement (i.e., the difference between measured value and the actual value) to the actual value multiply by 100.

Tables 4 and S4† show the data for TNT/NB/3NT and TNT/NB/2,4DNT ternary mixtures, respectively. The errors in the quantification of TNT varied from 2.3 to 15%, but errors increase for the other nitrocompounds.

Table 4 Quantification of TNT in TNT/NB/3NT ternary mixtures

	Calculated concentration (mM)					
	$C_{\text{TNT}}/C_{\text{NB}}/C_{\text{3NT}}$ 1:0.5:0.5 molar ratio ^a			$C_{\text{TNT}}/C_{\text{NB}}/C_{\text{3NT}}$ 1:1:1 molar ratio ^b		
	C_{TNT} (E %)	C_{NB} (E %)	C_{3NT} (E %)	C_{TNT} (E %)	C_{NB} (E %)	C_{3NT} (E %)
M*	0.071 (6.6)	0.029 (26.3)	0.031 (19.8)	0.065 (11.1)	0.06 (21.2)	0.068 (11.5)
E*	0.083 (6.8)	0.047 (21.0)	0.046 (18.3)	0.065 (10.7)	0.07 (15.7)	0.067 (14.0)
CS*	0.080 (2.6)	0.044 (14.2)	0.042 (8.7)	0.066 (9.0)	0.06 (22.6)	0.067 (14.0)

a Theoretical concentration: 0.076 mM (TNT) and 0.039 mM (NB and 3NT). b Theoretical concentration: 0.073 mM (TNT) and 0.077 mM (NB and 3NT). The E% is the ratio of the absolute error of the measurement (i.e., the difference between measured value and the actual value) to the actual value multiply by 100.

The aforementioned error can be considered as a good accuracy level for TNT quantification taking into account the closely related structures and the similarity of the quenching constants for the different analytes. This is possible due to the fact that the CS@Py nanohybrid provides information via three independent fluorescent channels. In short, for ternary mixtures of TNT, NB, and 3NT, the lowest accuracy errors, corresponding to the nanoparticle channel, were 2.6 and 9.0% as a function of the increase of the proportion of interferents. So, this clearly shows the tremendous flexibility of the CS@Py nanohybrid.

The proposed approach is a fast and simple method for TNT quantification in mixtures and could be an alternative to currently used methodologies.^{29,30} Moreover, though not used in this TNT quantification, the data arising from the time-resolved studies, i.e., K_d values, could be used to provide additional equations or they could be combined with those of K_{sv} for the analysis of additional nitrocompounds species.

Conclusion

In summary, we report for the first time that CS@Py can be used as a fluorescent probe with three independent channels (single excitation/triple emission) and that it can be applied for analysing mixtures of compounds that can even have very similar structures and quenching efficiencies, by just using the variation in the fluorescence intensity of the three channels. Nevertheless, fluorescence lifetimes can double the information and thus further enhance the versatility of the nanohybrid in sensing. The strategy herein described for building a threechannel emissive probe could also be applied to design other nanohybrids by using emissive nanoparticles capped with organic chromophores able to generate excimers and exciplexes at the nanoparticle periphery.

Acknowledgements

We thank the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO Project CTQ2011-27758, CTQ2011-26507, CTQ2014-60174), and FGUV (REG) for financial support.

Notes and references

- 1 T. Liu, X. Liu, D. R. Spring, X. Qian, J. Cui and Z. Xu, *Sci. Rep.*, 2014, 4, 5418.
- 2 Y. Yang, Q. Zhao, W. Feng and F. Li, *Chem. Rev.*, 2013, 113, 192–270.
- 3 T. Minami, N. A. Esipenko, A. Akdeniz, B. Zhang, L. Isaacs and P. Anzenbacher, *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, 135, 15238–15243.
- 4 Z. Yang, J. Cao, Y. He, J. H. Yang, T. Kim, X. Peng and J. S. Kim, *Chem. Soc. Rev.*, 2014, 43, 4563–4601.
- 5 S. Xu and H. Lu, *Chem. Commun.*, 2015, 51, 3200–3203.

- 6 L.-K. Zhang, G.-F. Wu, Y. Zhang, Y.-C. Tian, Q.-X. Tong and D. Li, *RSC Adv.*, 2013, **3**, 21409–21412.
- 7 J. Wang, W. Lin and W. Li, *Biomaterials*, 2013, **34**, 7429–7436.
- 8 H. Chen, W. Lin, W. Jiang, B. Dong, H. Cui and Y. Tang, *Chem. Commun.*, 2015, **51**, 6968–6971.
- 9 Probes based on the excimer fluorescence have been reported; see ref. 10 and 11.
- 10 J. Zheng, J. Li, Y. Jiang, J. Jin, K. Wang, R. Yang and W. Tan, *Anal. Chem.*, 2011, **83**, 6586–6592.
- 11 C. Wu, L. Yan, C. Wang, H. Lin, C. Wang, X. Chen and C. J. Yang, *Biosens. Bioelectron.*, 2010, **25**, 2232–2237.
- 12 S. González-Carrero, M. de la Guardia, R. E. Galian and J. Pérez-Prieto, *ChemistryOpen*, 2014, **3**, 199–205.
- 13 C. E. Agudelo-Morales, R. E. Galian and J. Pérez-Prieto, *Anal. Chem.*, 2012, **84**, 8083–8087.
- 14 W. R. Collin, G. Serrano, L. K. Wright, H. Chang, N. Nuñovero and E. T. Zellers, *Anal. Chem.*, 2013, **86**, 655–663.
- 15 Y. Salinas, R. Martínez-Manez, M. D. Marcos, F. Sancenon, A. M. Costero, M. Parra and S. Gil, *Chem. Soc. Rev.*, 2012, **41**, 1261–1296.
- 16 M. E. Germain and M. J. Knapp, *Chem. Soc. Rev.*, 2009, **38**, 2543–2555.
- 17 M. S. Meaney and V. L. McGuffin, *Anal. Chim. Acta*, 2008, **610**, 57–67.
- 18 B. Balan, C. Vijayakumar, M. Tsuji, A. Saeki and S. Seki, *J. Phys. Chem. B*, 2012, **116**, 10371–10378.
- 19 K. K. Kartha, S. S. Babu, S. Srinivasan and A. Ajayaghosh, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134**, 4834–4841.
- 20 S.-R. Zhang, D.-Y. Du, J.-S. Qin, S.-J. Bao, S.-L. Li, W.-W. He, Y.-Q. Lan, P. Shen and Z.-M. Su, *Chem.–Eur. J.*, 2014, **20**, 3589–3594.
- 21 Y. Salinas, A. Agostini, E. Perez-Esteve, R. Martínez-Manez, F. Sancenon, M. Dolores Marcos, J. Soto, A. M. Costero, S. Gil, M. Parra and P. Amoros, *J. Mater. Chem. A*, 2013, **1**, 3561–3564.
- 22 W. W. Yu, L. Qu, W. Guo and X. Peng, *Chem. Mater.*, 2003, **15**, 2854–2860.
- 23 J. Aguilera-Sigalat, S. Rocton, J. F. Sanchez-Royo, R. E. Galian and J. Pérez-Prieto, *RSC Adv.*, 2012, **2**, 1632–1638.
- 24 J. Pérez-Prieto, *Photochem. Photobiol.*, 2013, **89**, 1291–1298.
- 25 J. Aguilera-Sigalat, V. F. Pais, A. Doménech-Carbó, U. Pischel, R. E. Galian and J. Pérez-Prieto, *J. Phys. Chem. C*, 2013, **117**, 7365–7375.
- 26 B.-K. Pong, B. L. Trout and J.-Y. Lee, *Langmuir*, 2008, **24**, 5270–5276.
- 27 M. Kubista, R. Sjoback, S. Eriksson and B. Albinsson, *Analyst*, 1994, **119**, 417–419.
- 28 I. E. Borissevitch, *J. Lumin.*, 1999, **81**, 219–224.
- 29 Quantification of TNT in multi-analyte detection (B. C. Giordano, C. Lindsay, K. Johnson Giordano, B. C., Lindsay, C., & Johnson, K. (2014)). *Chemometric Deconvolution of Continuous Electrokinetic Injection Micellar Electrokinetic Chromatography Data for the Quantitation of Trinitrotoluene in Mixtures of Other NACs* (No. NRL/MR/ 6110–14-9521). Naval Research Lab Washington Dc.
- 30 R. Polsky, C. L. Stork, D. R. Wheeler, W. A. Steen, J. C. Harper, C. M. Washburn and S. M. Brozik, *Electroanalysis*, 2009, **21**, 550–556. 90070

Three independent channels nanohybrids as fluorescent probes

Supplementary information

Synthesis of nitrotoluene (TNT)

Figure S1. HRTEM image of CS@Py

Table S1. PL data of CS, CS@PY and PySH in tetrahydrofuran at room temperature

Figure S2: Fluorescence decay kinetics and their fitting to exponential functions of time for Monomer, Excimer and Nanoparticle of CS@Py, in tetrahydrofuran

Figure S3 and S4: Absorption and emission spectra ($\lambda_{exc}= 340$ nm) of CS@Py at different concentration of the NAC (0-0.25 mM) in THF, under N₂ atmosphere.

Figure S5: Stern-Volmer plots showing the intensity and lifetime dependence of M*, E*, and CS* emission of CS@Py on NAC concentration.

Table S2 Stern-Volmer quenching constants for pyrene monomer, M*, pyrene excimer, E*, and nanoparticle in the CS@Py hybrid

Table S3. Quantification of TNT in TNT/NB/2,4DNT ternary mixtures

Synthesis of trinitrotoluene (TNT)

TNT synthesis was performed following the procedure described in the literature.^{1,2} Briefly, fuming sulfuric acid 30% (1.95 mL) was added in a three-necked flask (25 mL), and was cooled down to 0 °C in an ice-water bath. Then nitric acid 100% (0.6 mL) is added drop by drop under magnetic stirring, taking care that the reaction temperature does not exceed 15 °C. Subsequently 2,4-DNT (0.854 g) was added to the acid mixture, and the temperature was slowly increased to 90 °C, and allowed to stir 2 hours at this temperature. After, the reaction was allowed to cool (at 30 °C) and was added to deionized water (50 mL), and extracted in a separator funnel with dichloromethane. The extracts were dried with MgSO₄, and the solvent was evaporated under vacuum. Yellow solid was obtained with a yield of 70 %. The solid was recrystallized in chloroform-ethanol mixture, to give a yellow crystalline solid.

1. W. H. Dennis, D. H. Rosenblatt, W. G. Blucher and C. L. Coon, *Journal of Chemical & Engineering Data*, 1975, **20**, 202-203.
2. R. C. Dorey and W. R. Carper, *Journal of Chemical & Engineering Data*, 1984, **29**, 93-97.

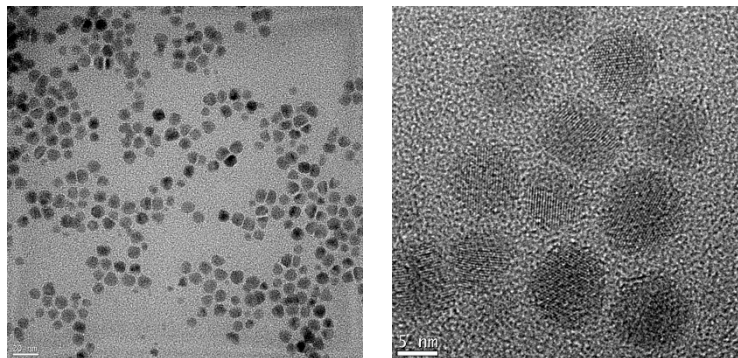
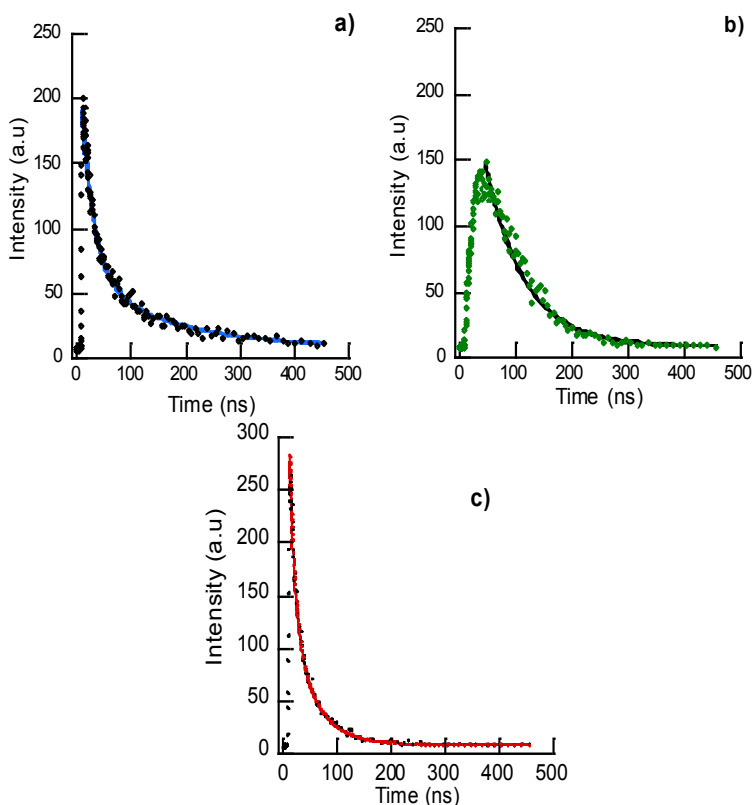


Figure S1. HRTEM images of CS@Py, diameter 8.4 ± 1.5 nm. Scale bar: a) 20 nm and b) 5 nm.

Table S1. PL data of CS, CS@PY and PySH in tetrahydrofuran at room temperature

	λ_{em}/nm^a	Φ_f^b	τ_1/ns (A ₁ %) ^c	τ_2/ns (A ₂ %) ^c	τ_a/ns^e	$k_k/(s^{-1})$	$k_{nr}(s^{-1})$
CS	640	37.7	45.5 (53)	16.0 (47)	38.4	9.82 10 ⁶	16.2 10 ⁶
PySH	397		94.7 (100) ^d				
	398		87.4 (36)	15.9 (64)			
CS@PY	480		53.3 (100)	17.3 (-112)			
	640	21.0	43.1 (46)	11.8 (56)	35.3	5.95 10 ⁶	22.4 10 ⁶

^a λ_{exc} = 340 nm. ^b Photoluminescence quantum yield. ^c Relative contribution to the biexponential fit. ^d Monoexponential fit. ^e Average lifetime, calculate as $\tau_{average} = \sum A_i \tau_i^2 / \sum A_i \tau_i$



230

Figure S2: Kinetic decay traces and their fitting to exponential functions of time for the emissive species of CS@Py in THF (λ_{exc} = 340 nm): a) M* (λ_{em} = 397 nm), b) E* (λ_{em} = 480 nm), and c) CS*.

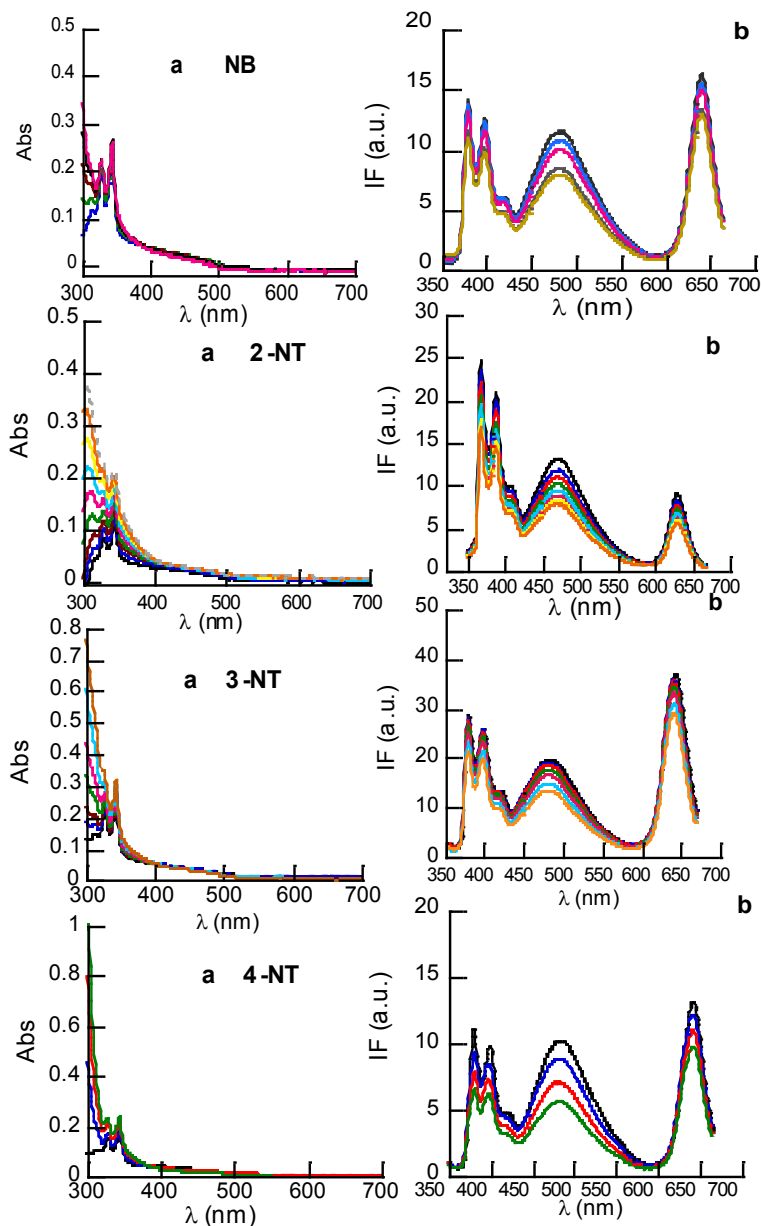


Figure S3: a) absorption and b) emission spectra ($\lambda_{exc}=340$ nm) of CS@Py (5 nM) at different concentration of the NAC (0-0.25 mM) in THF, under N_2 atmosphere.

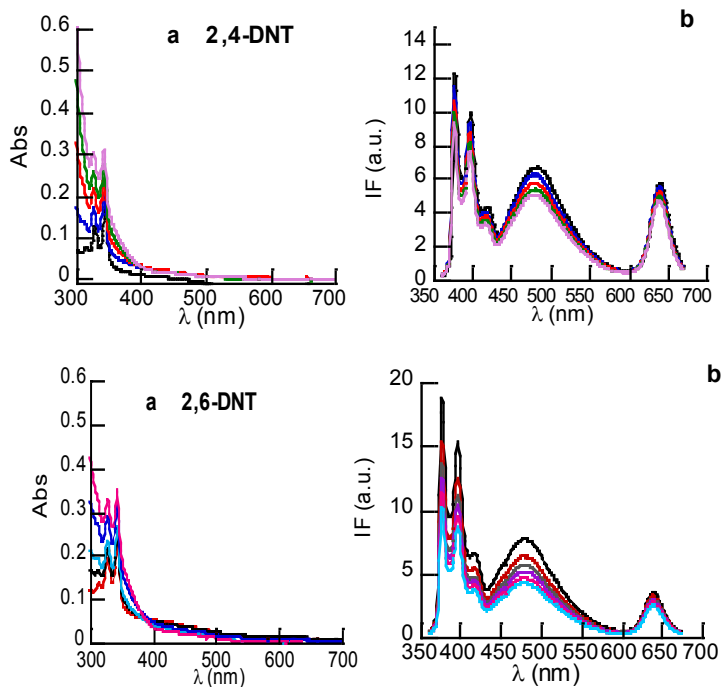


Figure S4: a) absorption and b) emission spectra ($\lambda_{\text{exc}}=340\text{ nm}$) of CS@Py (5 nM) at different concentration of the NAC (0-0.25 mM) in THF, under N_2 atmosphere.

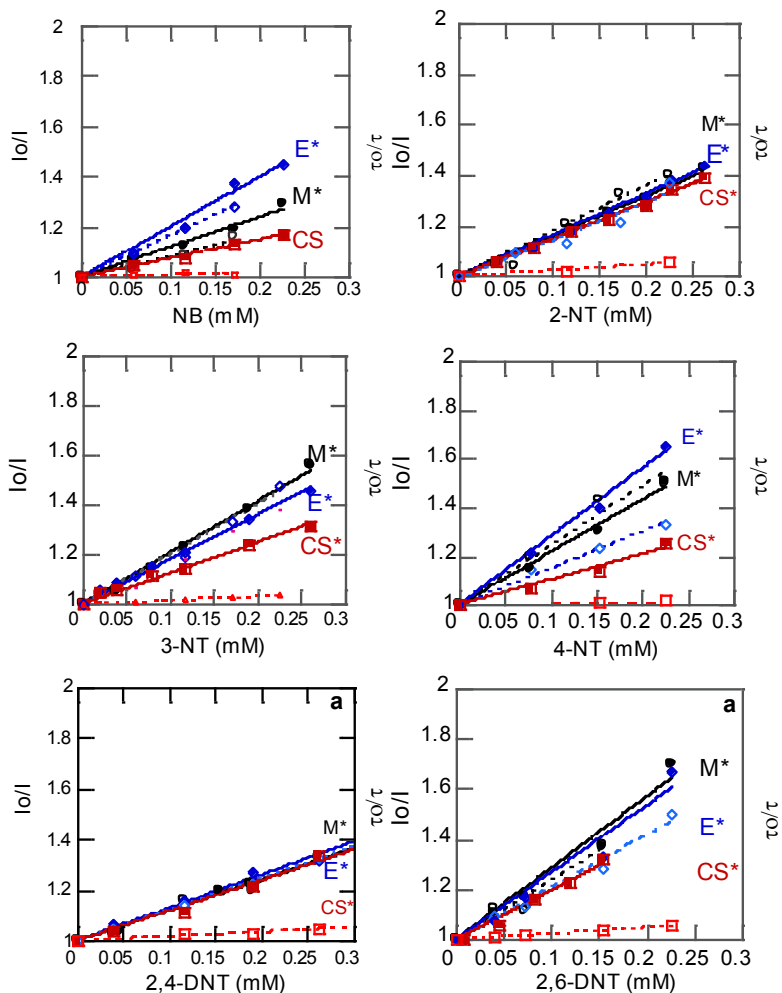


Figure S6. Stern-Volmer plots showing the intensity (—), and lifetime (---) dependence of M^* , E^* , and CS^* emission of $CS@Py$ (5 nM in THF, $\lambda_{exc}=340$ nm) on NAC concentration.

Table S2 Dynamic quenching constants of pyrene monomer, M*, pyrene excimer, E*, and nanoparticle excited state (CS*) in the CS@Py hybrid, by the nitroaromatic compounds.

	M*	E*	CS*
NB	838 ± 83 (0.990)	1654 ± 30 (0.998)	^b
2NT	1780 ± 117 (0.980)	1440 ± 103 (0.980)	238 ± 32 (0.990)
3NT	2014 ± 74 (0.992)	1676 ± 58 (0.993)	157 ± 3 (0.996)
4NT	2431 ± 160 (0.988)	1509 ± 72 (0.990)	194 ± 10 (0.990)
2,4 DNT	1193 ± 58 (0.980)	1243 ± 15 (0.998)	182 ± 21 (0.990)
2,6 DNT	2374 ± 230 (0.980)	2090 ± 88 (0.992)	244 ± 9 (0.992)
TNT	2094 ± 101 (0.990)	2208 ± 108 (0.985)	456 ± 10 (0.998)

^a K_d , (M^{-1}); data obtained from the time-resolved studies. Measurements.

^b. Too small to be determined.

Table S3. Quantification of TNT in TNT/NB/2,4DNT ternary mixtures.

	Calculated concentration (mM)					
	$C_{TNT}/C_{NB}/C_{2,4DNT}$			$C_{TNT}/C_{NB}/C_{2,4DNT}$		
	1:0.5:0.5 molar ratio ^a			1:1:1 molar ratio ^b		
	C_{TNT} (E %) ^c	C_{NB} (E %)	$C_{2,4DNT}$ (E %)	C_{TNT} (E %)	C_{NB} (E %)	$C_{2,4DNT}$ (E %)
M*	0.151 (2.3)	0.081 (9.5)	0.080 (8.6)	0.168 (11.2)	0.183 (23.1)	0.180 (21.0)
E*	0.152 (2.9)	0.081 (8.5)	0.082 (10.7)	0.175 (15.6)	0.186 (24.5)	0.193 (29.5)
CS*	0.141 (4.9)	0.068 (8.4)	0.070 (5.7)	0.152 (6.3)	0.173 (16.1)	0.164 (10.3)

^a Theoretical concentration: 0.148 mM (TNT) and 0.074 mM (NB and 2,4DNT).

^b Theoretical concentration: 0.151 mM (TNT) and 0.149 mM (NB and 2,4DNT).

^c The E% is the ratio of the absolute error of the measurement (i.e., the difference between measured value and the actual value) to the actual value multiply by 100



12. ARTÍCULOS PUBLICADOS NO RELACIONADOS CON LA TESIS

Further Insight into the Photostability of the Pyrene Fluorophore in Halogenated Solvents

Jordi Aguilera-Sigalat,^[a] Jaime Sanchez-SanMartín,^[a] Carlos E. Agudelo-Morales,^[a] Elena Zaballo,^[b] Raquel E. Galian,^{*,[a, c]} and Julia Pérez-Prieto^{*,[a]}

Pyrene fluorophores of pyrene-functionalized CdSe quantum dots (QD@Py), as well as alkylpyrene and pyrene itself (Py), undergo fast degradation in aerated chloroform under ultraviolet-A (UV-A, $316 < \lambda < 400$ nm) illumination. Steady-state fluorescence studies of irradiated chloroform solutions of QD@Py show formation of new bands, red-shifted compared to that of the pyrene moiety. Similar behaviour is observed for pyrene and the alkylpyrene system. Column chromatography of the pyrene photolysate in chloroform allowed us to isolate photoproducts arising from pyrene degradation, and to obtain information on the structure of the photoproducts responsible for the emission bands. The most predominant photoproducts were those originating from the reaction of pyrene with dichloromethyl radicals. The phototransformation of QD@Py and the alkylpyrene involves mainly detachment of the alkyl chain from the aromatic ring, induced also by dichloromethyl radi-

cals, and oxidation of the alkyl chain at the benzylic position was detected as well. By contrast, these pyrene systems show a high photostability in aerated dichloromethane. Transient absorption measurements showed formation of both pyrene triplet and pyrene radical cation for all pyrene systems in these halogenated solvents. The yield of pyrene radical cations for Py is higher than for QD@Py and the alkylpyrene. In addition, pyrene radical cations were longer-lived in dichloromethane than in chloroform. The reason for the pyrene photostability in dichloromethane is the different reactivity of chloromethyl and dichloromethyl radicals towards pyrene and oxygen. These studies show that the use of dichloromethane can be a suitable alternative to chloroform when the good solubility properties of these halogenated solvents are needed to dissolve pyrene when this chromophore is used as a fluorescent probe.

1. Introduction

Pyrene chromophores are widely used as probes because of 1) their absorption (strength) features, 2) their considerably long singlet lifetime (> 100 ns)^[1] and the information that can be obtained from their fluorescence emission (I_3/I_1 ratio, the excimer-to-monomer ratio, and the polarization value), and 3) their long-lived pyrene radical cation (microsecond scale). Thus, these chromophores have been applied as probes to acquire information about the structure and dynamics of macromolecular systems,^[2–5] surface properties, and adsorption sites. They have also been used in fluorescent chemosensors that can recognize selectively chemical species (ions, oxygen, explosives,...) in potential analytical applications.^[6]

Pyrene undergoes significant photodegradation in several media (adsorbed onto cellulose and silica,^[7] or dissolved in methanol and acetic acid among others^[8–10]), that can have drastic effects on the accuracy of the analysis under consideration. In this respect, there is special concern about the use of this fluorophore in halogenated solvents.^[2] Yamada et al.^[11] have performed gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) analyses of photolysates, resulting from illumination of an mM pyrene chloroform solution using UV ($\lambda > 250$ nm) and sun-light. The formation of two isomeric pyrenecarboxaldehydes (one of them identified as 1-pyrenecarboxaldehyde), 1-chloropyrene, and a monooxygenated adduct of chloropyrene (whose structure is unknown) has been reported. Pyrene showed less photostability in the presence of oxygen than ni-

trogen, leading to a major formation of aldehydes. In spite of that, the pyrene chromophore is still used in chloroform for applications related to its fluorescent properties, because of its good solubility properties.^[12]

Interestingly, even though pyrene quickly transforms into stable photoproducts (whose structures have not been studied) when irradiated ($\lambda_{\text{exc}} = 338$ nm) in CCl_4 ,^[13] its photodegradation quantum yield in dichloromethane^[14] ($\lambda_{\text{exc}} = 311$ nm, high-pressure lamp in combination with an interference filter) is similar to that in water^[15] (1.8×10^{-3} vs 2.1×10^{-3}). The photo-

[a] J. Aguilera-Sigalat, J. Sanchez-SanMartín, C. E. Agudelo-Morales, Dr. R. E. Galian, Dr. J. Pérez-Prieto
Molecular Science Institute (ICMOL)
University of Valencia
C/Catedrático José Beltrán 2, 46980-Paterna, Valencia (Spain)
Fax: (+34) 963543274
E-mail: Julia.perez@uv.es

[b] Dr. E. Zaballo
Department Of Organic Chemistry
University of Valencia
C/Vicent Andrés Estellés sn, 46100-Burjassot, Valencia (Spain)

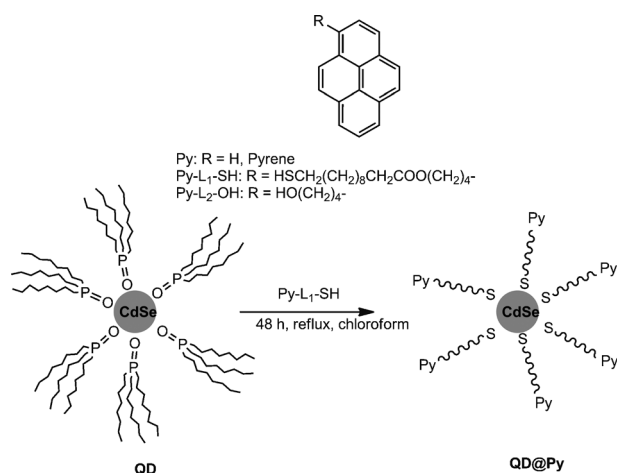
[c] Dr. R. E. Galian
Department of Analytical Chemistry
University of Valencia
C/Dr. Moliner 50, 46100, Burjassot, Valencia (Spain)
E-mail: raquel.galian@uv.es

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/cphc.201100843>.

chemical reaction in halogenated solvents is believed to occur through a pyrene singlet electron transfer to the solvent, followed by the reaction of the pyrene radical cation with the fragmentation products of the radical anion of the haloalkane.^[13] In water, it has been suggested that the first step involves an electron transfer from the excited singlet state of pyrene to molecular oxygen in a contact charge-transfer pair, followed by the reaction of the pyrene radical cation with water, leading to 1-hydroxypyrene as the initial photoproduct. A similar mechanism has been suggested for the photodegradation of pyrene on silica surfaces in the presence of oxygen (under simulated laboratory irradiation conditions and solar irradiation), where 1-hydroxypyrene is generated through the reaction of the pyrene radical cation with physisorbed water.^[10]

There is relatively little known about the structure of pyrene photoproducts in chloroform which renders further investigations on the photostability of pyrene-functionalized nanodevices in this solvent interesting. Such investigations will give information on the photodegradation process in halogenated solvents, so that it might be avoided.

In this study herein, we focus on a CdSe QD-pyrene nanohybrid and analyze its stability under UV-A illumination in chloroform. The influence of the nanoparticle (NP) on the outcome was studied by comparing the results of illuminating the nanohybrid with outcomes from pyrene (Py) and a 1-alkylpyrene analogue (Py-L₂-OH, Scheme 1) under the same reaction conditions. In addition, the photostability of the pyrene systems was also analyzed in dichloromethane.



Scheme 1. Structures of pyrene, Py-L₁-SH, Py-L₂-OH, and QD@Py.

Steady-state irradiations demonstrated the considerable photostability of pyrene systems in dichloromethane under UV-A illumination. Photophysical studies of these systems in chloroform and dichloromethane, together with isolated photoproducts arising from pyrene degradation in chloroform, gave solid information about the actual photodegradation process of pyrene in halogenated solvents.

2. Results and Discussion

2.1. Synthesis of Pyrene-Functionalized CdSe Nanoparticles.

Mercapto-stabilized NPs decorated with pyrene moieties (QD@Py) were prepared by reaction of QD@TOPO (TOPO: triocetyl phosphine oxide) with Py-L₁-SH^[16] (Scheme 1) under chloroform reflux ([thiol]/[QD] = 3375 molar ratio) for 48 h. After purification, the UV/Vis absorption spectrum of QD@Py showed the first exciton peak of the QD at 529 nm, as well as the presence of the pyrene moiety (Figure S1 in the Supporting Information). The size of the nanoparticle obtained by high resolution transmission electron microscopy (HRTEM) was of 2.4 ± 0.4 nm (Figure S2 in the Supporting Information). The ¹H NMR spectrum of QD@Py showed a broadening of the ligand signals, indicating that it is strongly bound to the QD surface (see spectra of Py-L₁-SH and QD@Py in Figures S3A and S3B in the Supporting Information).

2.2. Photophysical Studies

An important deactivation of the QD emission (λ_{\max} at 543 nm) was observed after the exchange of TOPO by a thiol ligand (Figure S4 in the Supporting Information), which may be due to the transfer of a hole from the excited QD to the mercapto group on the QD surface.^[17] In fact, pyrene was the main fluorophore in QD@Py. Figure 1a shows the comparison of the emission spectra of deaerated solutions of Py-L₂-OH and QD@Py in toluene. These samples were adjusted to the same pyrene absorbance at λ_{ex} 355 nm (Abs = 0.4).

These spectra evidenced the high local concentration of pyrene on the QD@Py, leading to Py excimer formation (λ_{\max} at 480 nm), while only monomer emission (λ_{\max} at 376, 396, and 417 nm) was detected for Py-L₂-OH. In addition, the CdSe core QD and oxygen strongly reduced the pyrene fluorescence quantum yield (Figure 1).^[18]

Laser flash photolysis (LFP, Nd:YAG, 355 nm, 10 ns laser pulse) of deaerated chloroform solutions of QD@Py at 355 nm (Abs ca. 0.3) showed the formation of the pyrene triplet (QD@³Py, λ_{\max} ca. 420 nm and $\tau_{\text{T}} = 7.0 \mu\text{s}$, Figure 2a and Table 1). The generation of the pyrene radical cation (QD@Py⁺, λ_{\max} ca. 450 nm, $\tau = 8.2 \mu\text{s}$) was more evident in the presence of air (Figure 2b). Py-L₂-OH led to the same transients (Figure 2c, d), that is, the pyrene triplet (³Py-L₂-OH) and the pyrene

Table 1. Lifetime of the triplet (τ_{T}) and the radical cation (τ_{RC}) of the pyrene systems.

System	τ_{T} [μs]	τ_{RC} [μs]	Solvent
Py	1.81 ± 0.02	4.09 ± 0.05	CHCl ₃
Py-L ₂ -OH	1.88 ± 0.04	7.0 ± 0.5	
QD@Py	7.0 ± 0.5	8.2 ± 0.3	
Py	1.23 ± 0.02	22.1 ± 0.4	CH ₂ Cl ₂
QD@Py	3.7 ± 0.2	24 ± 1	
Py	1.30 ± 0.01	n.d.	THF
Py-L ₂ -OH	9.3 ± 0.1	n.d.	
QD@Py	9.7 ± 0.2	n.d.	

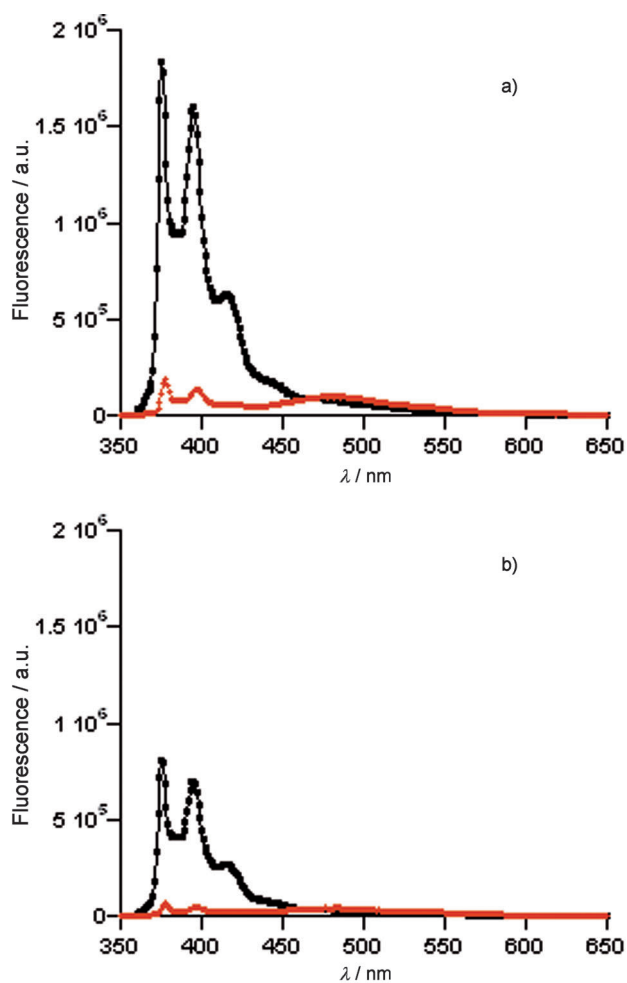


Figure 1. Fluorescence spectra of toluene solutions of Py-L₁-OH (■) and QD@Py (●) under anaerobic (a) and aerobic (b) atmosphere. The samples were adjusted to the same absorbance at 355 nm.

radical cation (Py^{•+}-L₂-OH). ³Py-L₂-OH was obtained in similar yields as from QD@Py, despite the competitive formation of the pyrene excimer in the latter system. This can be attributed to the partial decay of the excimer to produce the pyrene triplet.^[19,20]

The yield of radical cations was higher for Py (Figure 2e), but these species were shorter-lived (4.09 μs) than Py^{•+}-L₂-OH and QD@Py^{•+}. In addition, the pyrene triplet (³Py) lifetime was similar to that of Py-L₂-OH and shorter than that of QD@Py.

As expected, the triplet of all the pyrene systems was shorter-lived in aerated solutions (τ ca. 0.4 μs), while the radical cations showed low reactivity towards oxygen.

Transient absorption measurements were also performed in other solvents, such as dichloromethane. Interestingly, the lifetimes of the radical cations (τ_{RC}) of the pyrene systems (see Py^{•+} and QD@Py^{•+} in Table 1) were much longer in dichloromethane (τ_{RC} ca. 22 μs)^[21] than in chloroform. In addition, the yield of Py^{•+} was 30% lower in dichloromethane. As in the case of chloroform, the pyrene triplet was the main species for the alkylpyrene systems in dichloromethane.^[22] In tetrahydrofuran (THF), the pyrene triplet was the only detected species in all the pyrene systems.

2.3. Photostability Studies of the Pyrene Systems under UV-A-Lamp Irradiation

A Luzchem photoreactor equipped with ten lateral UV-A-lamps, emitting at 316 nm <math>\lambda < 400 \text{ nm}</math> and λ_{max} at 351 nm, was used for the irradiation experiments. Samples were irradiated in 1 cm pathway quartz cells.

The photostability of QD@Py was initially analyzed in chloroform, following the changes of the UV/Vis spectra of the NPs. A brief UV-A-lamp irradiation (less than 30 min) of chloroform solutions of QD@Py, in the presence and in the absence of air, caused a drastic transformation of the whole NP. Not only the absorption bands of pyrene strongly decreased, but the exciton peak of the NP was also influenced (Figure 3).

The fluorescence spectra of the QD@Py photolysate showed a new structured band (λ_{max} at 399 and 420 nm), red-shifted compared to that of the pyrene moiety (λ_{max} at 376, 396, and 417 nm), together with broad-bands at longer wavelengths (λ_{max} at ca. 450 and 490 nm, Figure 4).

For comparative purposes, the photostability of Py-L₂-OH and Py under UV-A-lamp illumination was also studied. The absorption spectra of the Py-L₂-OH photolysates (Figures 5a and S5 in the Supporting Information) showed it leads to analogous photoproducts to those of the capping ligand of QD@Py (Figures 3 and S6 in the Supporting Information).

Similarly to the QD@Py photolysate, the emission spectra of the Py-L₂-OH photolysates showed a structured emission band (λ_{max} ca. 395 and 420 nm) together with considerably red-shifted broad emission bands (λ_{max} at 440, and a broad-emission from 450 to 525 nm). By contrast, though the appearance of the emission spectra of the photolysate of Py also evidenced a structured band with maxima at ca. 388 and 408 nm and a broad band at λ_{max} ca. 450 nm, the band from 450 to 600 nm showed a well-structured shape (Figure 5d). The evolution of the fluorescence spectra of the photolysates of the pyrene systems as a function of the irradiation time is shown in Figures S7–S9 in the Supporting Information.

In addition, experiments performed in distilled chloroform showed that the rate of pyrene transformation drastically increases in the absence of the solvent stabilizer (ethanol). Furthermore, Py-L₂-OH was also irradiated in chloroform inside the cell compartment of the spectrofluorometer. The excitation spectrum was monitored at 480 nm after 200 scans. It showed the appearance of a band in the 380–430 nm range. These results are consistent with some photodegradations of the pyrene compound under the excitation conditions typically used for photophysical measurements (Figure S10 in the Supporting Information).^[2]

Remarkably, experiments performed in amylene-free dichloromethane^[23] showed a considerable photostability of the pyrene chromophore as well as of the CdSe core of QD@Py. The QD exciton peak and the pyrene chromophore underwent a transformation that could hardly be perceived (Figure S11 in the Supporting Information) after 50 min of UV-A irradiation in the presence of air. Likewise, Py-L₂-OH and Py showed a high photostability in dichloromethane.

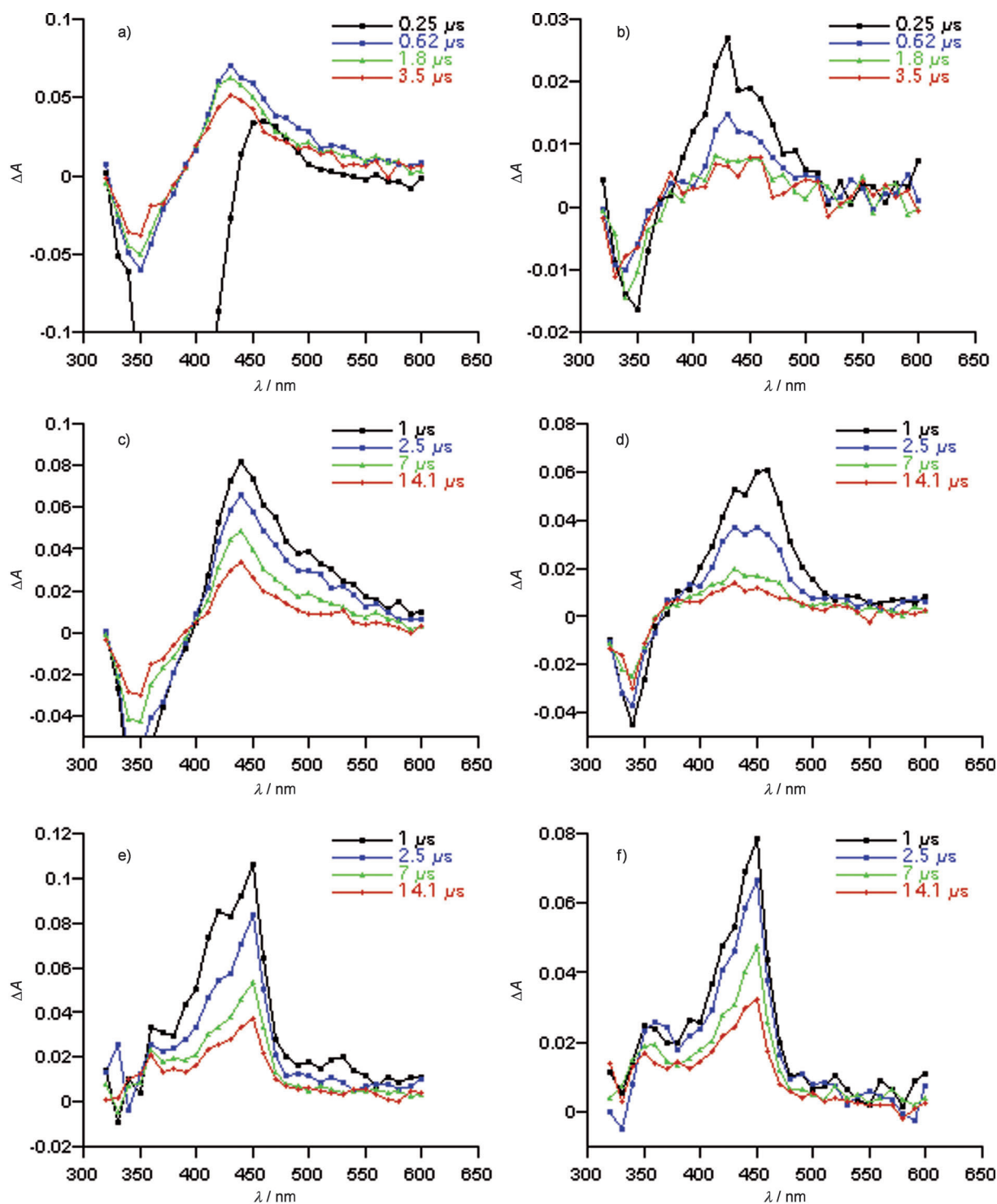


Figure 2. Transient absorption spectra of chloroform solutions of QD@Py (a,b), Py-L₂-OH (c,d), and Py (e,f) recorded under anaerobic (a,c,e) and aerobic (b,d,f) atmosphere. The elapsed time after the laser (355 nm) pulse is indicated. All samples absorbed 0.3 at the laser excitation wavelength.

2.4. Photoproducts Arising from the Lamp Irradiation of the Pyrenes in Chloroform

An aerated chloroform solution of pyrene (100 mL solution, 3.3×10^{-4} M) was irradiated (UV-A-lamps, emitting at $316 < \lambda < 400$) inside the cell in the photoreactor for 12 h. The fluorescence spectra of the photolysate showed a drastic decrease of

Py emission and the formation of photoproducts with emissions at longer wavelengths than pyrene (Figure 6).

The photoproduct mixture was analyzed by GC/MS. The spectrum showed a molecular ion peak of pyrene (m/z 202, 70%), together with peaks at m/z 236 (3%, I), 252 (2%, II), 230 (8%, III), 230 (13%, IV), and 252 (3%, V). The peak at m/z 236 [m/z at 236 (M^+), 200 ($M-HCl$), 118, and 100] was assigned to

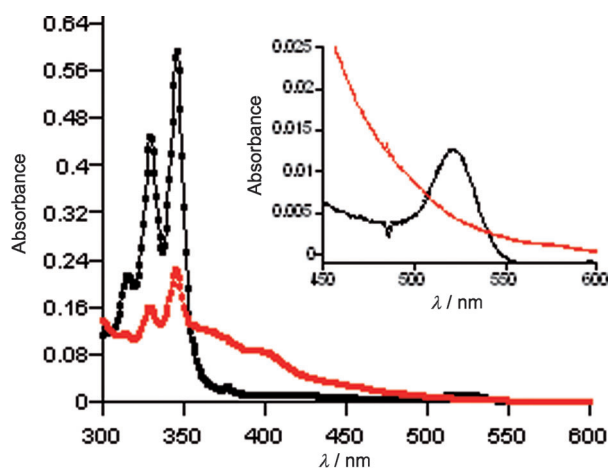


Figure 3. Absorption spectra of chloroform solutions of QD@Py (1.75×10^{-7} M) before (■) and after (●) UV-A-lamp irradiation for 30 min in the presence of air.

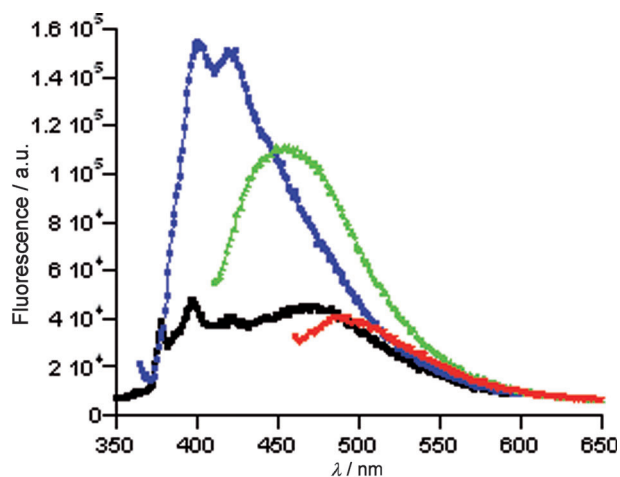


Figure 4. Emission spectra of chloroform solutions of QD@Py (1.75×10^{-7} M) after 30 min UV-A-lamp irradiation in the presence of air. Spectra were recorded at λ_{ex} 313 nm (■), 355 nm (●), 400 nm (▲), and 450 nm (▼).

1-chloropyrene, based on literature data for this compound.^[24] Those at m/z 230 have been ascribed to pyrenecarboxaldehydes (Scheme 2).

The NMR spectrum of the photolysate mainly showed the presence of pyrene, 1-pyrenecarboxaldehyde (IV), and 4-pyrenecarboxaldehyde (III)^[25] (pyrene/aldehyde molar ratio of 2.5/1.0, IV/III molar ratio of 1.5/1.0, see ^1H NMR in Figure S12 in the Supporting Information).^[26]

Column chromatography of the Py photolysate (hexane: ethyl acetate 9:1) made it possible to gain more information on the structure of the photoproducts responsible for the emission bands. They can be classified into three types of products (Scheme 2): 1) those containing a Cl substituent (Type A), 2) those derived from dichloromethyl radical incorporation (Type B), and 3) those without incorporation of species arising from chloroform (Type C).

Figure 7a,b show the absorption and emission spectra of photoproduct V with m/z at 252 for the molecular ion (Fig-

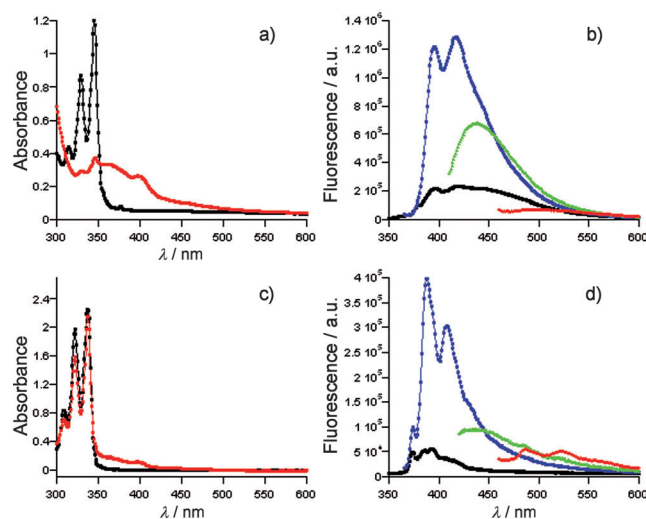


Figure 5. Absorption spectra of 4×10^{-5} M of Py- L_2 -OH (a) and 3.3×10^{-4} M of Py (c) before (■) and after 60 min UVA-lamp illumination in aerated chloroform (●). Emission spectra of Py- L_2 -OH (B) and Py (d) after 60 min UV-A-lamp illumination in aerated chloroform; spectra were recorded at λ_{ex} 313 nm (■), 355 nm (●), 400 nm (▲) and 450 nm (▼).

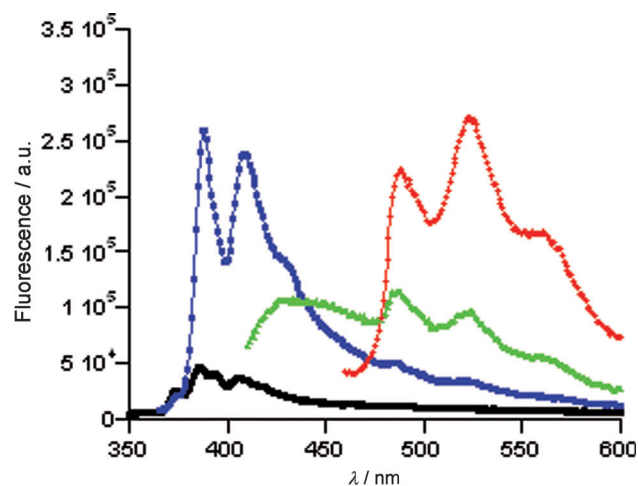
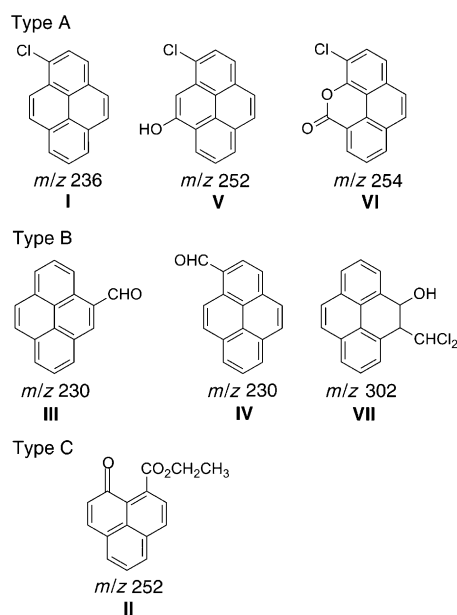


Figure 6. Emission spectra of aerated chloroform solutions of Py (3.3×10^{-4} M) after 12 h UV-A-irradiation; spectra recorded at λ_{ex} 313 nm (■), 355 nm (●), 400 nm (▲), and 450 nm (▼).

ure S13 in the Supporting Information). Its high resolution mass spectrum (HMRS) presented a m/z for $[M+H]^+$ of 253.0415, which agrees with a $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{OCl}$ molecular formula. This compound exhibits a structured emission at λ_{max} of ca. 390 and 400 nm and a slightly red-shifted absorption spectrum compared to that of Py. These data together with the NMR spectra of compound V (Figures S14–S17 in the Supporting Information) are in agreement with a structure of a chloropyrenol. Control experiments showed that this compound was not generated during irradiation of aerated chloroform solutions of either 1-pyrenol or 1-chloropyrene. A 6-chloropyren-4-ol structure was postulated for compound V (Scheme 2), based on its phototransformation in compound VI.



Scheme 2. Proposed structure for the compounds isolated after lamp irradiation of pyrene in aerated chloroform.

The compound with the structured emission from 460 to 650 nm (λ_{max} at 490, 523, 560 nm, Figure 7d) was not detected in the GC spectrum of the photolysate, but its strong green fluorescence ($\Phi_f = 0.64$ in deaerated CHCl_3) made it possible to follow its formation during pyrene irradiation. This compound presents a considerable absorption in the 370–500 nm region (Figure 7c) and is a bright orange solid. Its structure was established by HRMS, IR, and ^1H NMR (in comparison with published data of 5-H-phenanthro[4,5-bcd]pyran-5-one). Its ^1H NMR spectrum showed signals at 7.72 (d, 9.6 Hz, 1H), 7.83 (d, 9.04 Hz, 1H), 7.90 (dd, 7.9 and 7.7 Hz, 1H), 8.05 (d, 9.8 Hz, 1H), 8.13 (d, 7.9 Hz, 1H), 8.32 (d, 7.7 Hz, 1H), 8.42 (d, 9 Hz, 1H) ppm (NMR spectra Figures S18 and S19 in the Supporting Information).^[27] Its GC/MS spectrum presents a peak at m/z 254 (Figure S20 in the Supporting Information) and fragment ions at 226 ($M^+ - 28$) and 198 ($M^+ - 56$), which might be attributed to a polycyclic, unsaturated lactone (loss of m/z 56, corresponding to C_2O_2). This is in accordance with the absorption peak at 1715.2 cm^{-1} in its IR spectrum. Its HMRS presented a m/z for $[M+H]^+$ of 255.0208, which agrees with a $\text{C}_{15}\text{H}_9\text{O}_2\text{Cl}$ molecular formula. Data suggested formation of the 3-chloro-5H-naphtho[8,1,2-cde]chromen-5-one structure.

Control experiments showed that compound VI was not generated in the irradiation of aerated chloroform solutions of 1-chloropyrene. However, formation of 4-oxapyrene-5-one has been proposed in the photocatalytic reaction of pyrene at $\text{TiO}_2/\text{water}$ interfaces,^[28] in the electrochemical oxidation of pyrene,^[29] and in the reaction of gas phase O_3 with pyrene adsorbed on silica particles.^[30] The evolution of the fluorescence spectra of the pyrene photolysate as a function of the irradiation time (Figure S7 in the Supporting Information) showed that compound VI appeared after a considerable irradiation time and that it could originate from compound V. This was

confirmed by irradiation of compound V for a short period of time (not shown).

Figure 7e,f show the absorption and emission spectra of a mixture of the pyrenecarbaldehydes, which exhibit a broad emission at λ_{max} of ca. 430 nm and their longest wavelength absorption is in the 320–420 nm region (NMR spectrum S21 in the Supporting Information).^[31] These compounds were by far the most abundant photoproducts.

In addition, we isolated a photoproduct whose GC/MS spectrum presented a peak at m/z 302 for the molecular ion and fragment ions at 285 ($M^+ - 10$) and 202 ($M^+ - 100$), which represented the probable loss of OH and CHCl_2 (Figure S22 in the Supporting Information). Its HMRS did not show the m/z for M^+ but a m/z of 285.0027, which agrees with the molecular formula of the fragment $\text{C}_{17}\text{H}_{11}\text{Cl}_2$. This compound was not even detected in the GC/MS spectrum of the photolysate, which indicates it is obtained in a very low yield. Its ^1H NMR spectrum showed signals at 4.02 (dd, 6.4 and 2.3 Hz, 1H), 5.53 (d, 2.3 Hz, 1H), 5.81 (d, 6.6 Hz, 1H), 7.59–7.65 (m, 3H), 7.81 (bs, 2H), 7.88–7.91 ppm (m, 2H) (Figure S23 in the Supporting Information). These data suggest the attachment of hydroxyl and dichloromethyl moieties to the 4- and 5-position of pyrene, and therefore the formation of 5-dichloromethyl-4,5-dihydroxy-1-pyrenebutanal (compound VII, Scheme 2). Moreover, we succeeded in isolating the other photoproduct detected in the pyrene photolysate whose GC/MS spectrum presented a peak at m/z 252 for the molecular ion (compound II, spectrum in Figure S24 in the Supporting Information). Fragment ions at 223 ($M^+ - 29$) and 207 ($M^+ - 45$) represented the probable loss of an ethoxy group. Its structure was established by HRMS, IR, and ^1H NMR (in comparison with published data of phenalene-9-one and 9-formylphenalene-9-one). Its UV-absorption spectrum (Figure 8) resembles that of phenalene-9-one.^[32,33] Its HMRS showed the m/z for MH^+ at 253.0862, which agrees with the $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{O}_3$ molecular formula. These data together with those from the NMR measurements (Figures S25–S28 in the Supporting Information) suggest formation of ethyl 1-oxo-1H-phenalene-9-carboxylate. Control experiments showed that this compound was not generated during irradiation of aerated chloroform solutions of 1-chloropyrene. However, this compound was detected (GC/MS) when the solvent of chloroform solutions of 1-pyrenol were eliminated under mild heating.

Steady-state irradiation of $\text{Py-L}_2\text{-OH}$ was also performed in aerated chloroform solutions ($3.5 \times 10^{-4}\text{ M}$) for 30 h to obtain information on the photoproducts structure. Remarkably, NMR spectra of the photolysate revealed the presence of mainly 1-pyrenecarbaldehyde, while the GC/MS analysis showed peaks at m/z 236 (35%), 230 (70%), 244 (15%), and $\text{Py-L}_2\text{-OH}$ (9.5%). The peak at m/z 230 fits well with that of 1-pyrenecarbaldehyde. The peak at m/z 236 is 1-chloropyrene, and that at m/z 244 can be assigned to 1-(pyrene-1-yl)ethanone. These results suggest that the phototransformation of the 1-alkylpyrene involves detachment of the alkyl chain from the aromatic ring as well as oxidation of the alkyl chain at the benzylic position.

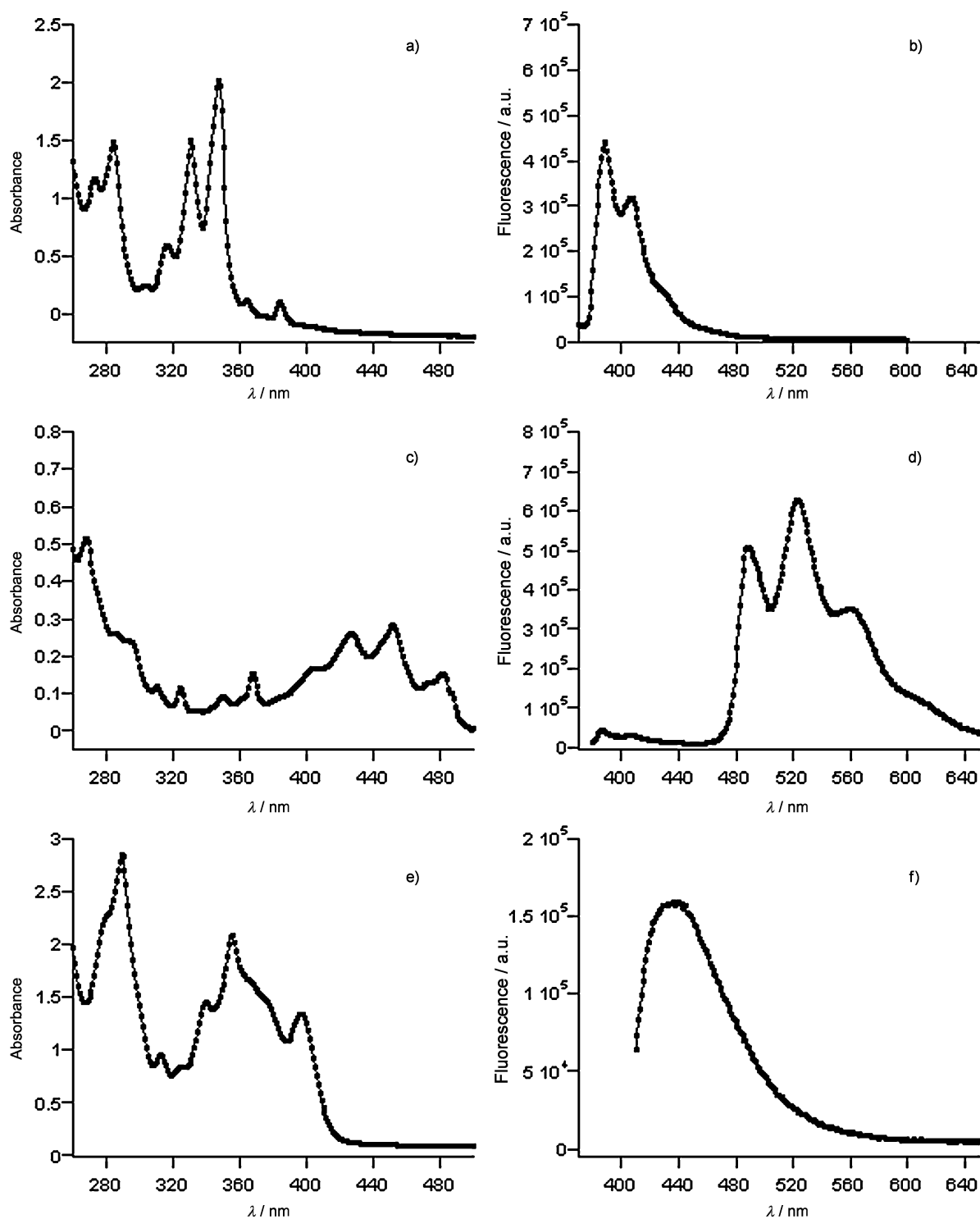


Figure 7. Absorption and emission spectrum ($\lambda_{\text{ex}}=355$ nm) of compounds V (a,b); VI (c,d), and VII (e,f).

2.5. Mechanistic Proposal of the Photodegradation of the Pyrene Systems

Plausible explanations for the phototransformation of the pyrene systems under UV-A illumination are depicted in Scheme 3 and Scheme 4. Electron transfer from the pyrene excited state to the halogenated solvents (chloroform and dichloromethane) would lead to the haloalkane radical anion as

well as the radical cation of the aromatic molecule. The pyrene radical cation was detected by laser flash photolysis technique in both halogenated solvents (the rapid dissociation of the haloalkane radical anion into products impedes rapid back-electron transfer to the pyrene radical cation).

The higher photostability of pyrene in dichloromethane together with the fact that pyrenecarbaldehydes were the main

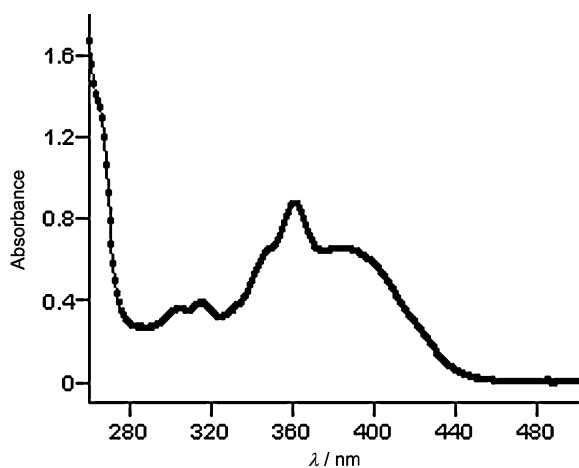
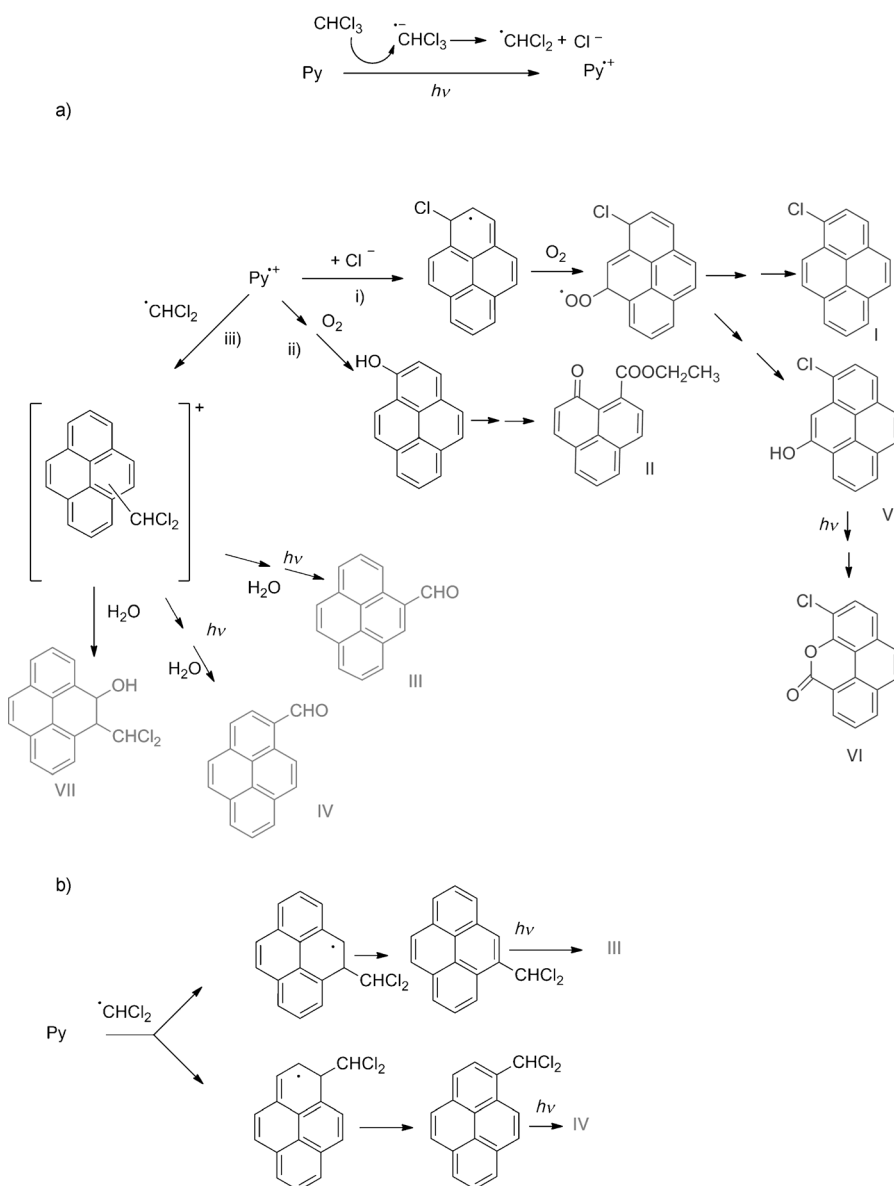


Figure 8. Absorption spectrum of compound II.



photoproducts in the degradation of pyrene in chloroform, suggests that the haloalkane radical, and not the chloride anion, is the main solvent species responsible for the transformation of pyrene. Indeed, pyrene photodegraded faster in distilled chloroform.

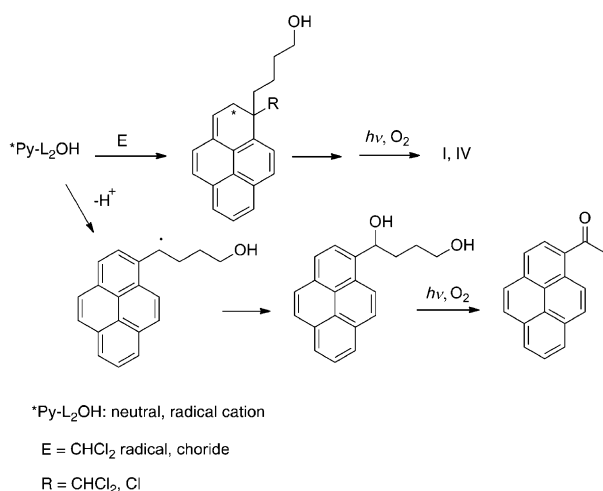
Therefore, the high stability of the pyrene systems in dichloromethane should be attributed to the lower reactivity of $\text{CH}_2\text{Cl}^\cdot$ radicals towards pyrene, together with their higher reactivity towards oxygen, compared to CHCl_2^\cdot radicals.^[34]

In the case of chloroform, the halomethyl radicals could react with $\text{Py}^{+\cdot}$ (Scheme 3a,ii). Alternatively, the addition of the haloradicals to Py could be a competitive reaction (Scheme 3b). It is known that polycyclic aromatic compounds generate radicals that are incapable of continuing the chain. So, pyrene is considerably more reactive (>1000 times) than benzene towards the addition of CCl_3^\cdot radicals, though four times less reactive than anthracene, for which a quantum efficiency of 0.4 has been reported

for the UV-light induced reaction with CCl_4 .^[35]

Pyrene has five chemically distinct carbons and, in principle, five CHCl_2 -adduct radicals could be generated. It has been demonstrated that H(muonium^[36]) addition to pyrene mainly gives rise to two hydroxypyrenyl radicals (1-Mu-pyrenyl and 4-Mu-pyrenyl, the first being the main product).^[37] Other studies have also shown that ground state pyrene is more easily attacked by radicals at the 1-position.^[38] In addition, selective attachment of alkyl radicals to the 1-position of pyrene upon irradiation at $\lambda > 300$ nm in solid n-alkane matrices has also been reported.^[39] These data are in agreement with the formation of 1-, and 4-pyrenecarbaldehydes in a 1.5/1.0 molar ratio.^[40]

A barely competitive process was the addition of chloride ions to pyrene radical cations leading to 1-chloropyrene and 1-chloropyren-2-ol (Scheme 3a,i). Some 1-chloropyrene has shown to be formed without photoexcitation of pyrene.^[11] Taking the control experiments into account, lactone VI and compound II could derive from 6-chloropyrene-4-ol and 1-pyrenol, respectively, which are compounds generated through the pyrene radical cation (Scheme 3a,i and ii).



Scheme 4. Mechanistic proposal for the photodegradation of Py-L₂-OH

Oxygen radical anions, arising through electron transfer from the pyrene singlet excited state to molecular oxygen,^[41,42] could subsequently act as oxidant species.

On the other hand, the formation of 1-pyrene-carbaldehyde in the photolysis of 4-(1-pyrenyl)butanol in chloroform requires the ipso substitution of the alkyl chain by CHCl₂· radicals (Scheme 4). The addition of solvent species to pyrene or the pyrene radical cation, followed by β-scission of the aryl-alkyl C–C bond could be responsible for the chain detachment. The radical mechanism has been suggested in the pyrolyses of 1-alkylpyrene.^[43] A less competitive process would be the addition of the chloride anion to pyrene radical cations and the subsequent alkyl chain detachment.

In addition, the alkyl chain oxidation could arise from loss of a proton from the Py-L₂-OH radical cation, followed by the reaction with oxygen. Further oxidation of the benzylic-like alcohol would lead to the corresponding ketone, whose Norrish II photocleavage would produce 1-acetylpyrene.

As a consequence, the high stability of the pyrene systems in dichloromethane should be attributed to the low reactivity of CH₂Cl radicals towards the aromatic ring together with their higher reactivity towards oxygen.^[34,44]

Finally, it is worth mentioning that pyrene systems proved to be as photo-unstable in other non-halogenated solvents, such as THF (high pyrene photodegradation after 30 min of UV-A irradiation, spectrum not shown), as in chloroform.

3. Conclusions

In summary, pyrene fluorophores are widely applied, in relation with its fluorescent properties, for designing many molecular, as well as macro- and supra-molecular functional devices. Such studies are frequently performed in chloroform, due to the good solubility properties of this solvent.

However, we demonstrated that chloroform combined with illumination causes a considerable photodegradation of different types of pyrene systems, and that dichloromethyl radicals play a key role in such processes.

Interestingly, we showed that dichloromethane can be a suitable alternative to chloroform in those applications of pyrene systems requiring the use of light. Surprisingly, chloromethyl radicals hardly react with pyrene structures, and furthermore they protect the chromophore from photooxidation. These findings will be useful for a wide variety of aromatic dyes and fluorophores,^[45] since they may well undergo electron transfer to haloalkanes under light illumination.

Experimental Section

Materials: All reagents were commercially available and used as received. The 11-mercaptoundecanol (MU), and 1-pyrenebutanol were purchased from Sigma–Aldrich. Solvents for chromatography (ethyl acetate and hexane) were reagent grade and used without further purification.

Characterization: UV/Vis spectra of the samples were recorded using a quartz cuvette spectrometer in a UV/Visible spectrophotometer Agilent 8453E. The average diameter value of the nanoparticles was estimated following the Peng et al.^[46] procedure.

Steady-state fluorescence spectra (LPS-220B, motor driver (MD-5020), Brytebox PTI) were measured on a spectrofluorometer PTI, equipped with a lamp power supply and working at room temperature. The Felix 32 Analysis software was used to register the data. The fluorescence quantum yield was calculated by following the procedure of Resch–Genger et al.^[47]

Laser flash photolysis (LFP) studies were performed on a pulsed Nd:YAG laser, using 355 nm as excitation source. The pulses width was ca. 10 ns, and the energy was ca. 15 mJ pulse⁻¹. A xenon lamp was employed as the detecting light source. The apparatus consisted of a pulsed laser, a Xe lamp, a monochromator, and a photomultiplier (PMT) system. The output signal from the oscilloscope was transferred to a personal computer. Samples were prepared such that they absorbed ca. 0.3 at 355 nm and they were bubbled with nitrogen for 10 min.

Images from the QDs were obtained by high resolution transmission electron microscopy (HRTEM, FEI Tecnai G2 F20) at an accelerating voltage of 200 kV. Samples were prepared by dropping the colloidal solution on a Lacey Formvar/carbon-coated copper grid. The digital analysis of the HRTEM micrographs was done using digital Micrograph™ 1.80.70 for GMS by Gatan.

TLC was performed on Merck Silica Gel 60 F254 aluminum sheets and developed by UV light and ethanolic sulfuric acid (5% v/v). Flash column chromatography was performed on Merck Silica Gel (230–400 mesh, ASTM).

Mass spectra were obtained by electron impact (EI) at 70 eV or chemical ionization (CI). High resolution mass spectra were recorded on an AB SCIEX TripleTOF 5600 instrument.

¹H-, ¹³C-, and 2D-NMR (COSY, HMQC and HMBC) spectra were recorded on Bruker Avance DPX300, 400, and 500. Standard Bruker software was used for acquisition and processing routines. Chemical shifts are given in ppm and *J* values are given in Hz. Carbon substitution degrees were established by DEPT pulse sequences. COSY, HMQC, and HMBC experiments were utilized to obtain additional information. IR spectra were measured using a FT-IR Nicolet IS10 instrument.

Synthesis of 4-(pyren-4-yl) butyl-11-mercaptoundecanoate (Py-L1-SH)^[18]: The Py-SH ligand was prepared following an esterification method described in the literature. In brief, 4-(1-pyrenyl)butanol (722 mg, 2.6 mmol) and 11-mercaptoundecanoic acid (574 mg, 2.6 mmol) were dissolved in anhydride toluene (30 mL). A complex

of hafnium/THF (2 mg) was added and the mixture was heated for 48 h under azeotropic reflux conditions to remove water through a Soxhlet thimble with 3 Å molecular sieves. In order to quench the reaction, 1 mL of water was added. After solvent removal, the product was purified by column chromatography using hexane:ethyl acetate solvents (9:1). The compound was obtained in a 89% yield.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 1.07–1.20 (m, 12H), 1.23 (t, *J* = 7.7 Hz; 1H), 1.43–1.57 (m, 4H), 1.68–1.93 (m, 4H), 2.21 (t, *J* = 7.7 Hz; 2H), 2.41 (q, *J* = 7.0 Hz; 2H), 3.30 (t, *J* = 7.8 Hz; 2H), 4.08 (t, *J* = 6.3 Hz; 2H), 7.76–7.81 (d, *J* = 7.8 Hz; 1H), 7.88–7.96 (m, 3H), 8.00–8.11 (m, 4H), 8.16–8.21 ppm (d, *J* = 9.3 Hz; 1H).

Synthesis of QD@Py: A chloroform solution (25 mL) of QD@TOPO (2.85 × 10⁻⁷ mol) Py-L1-SH (9.62 × 10⁻⁴ mol, [thiol]/[QD] = 3375 molar ratio) was heated to reflux under nitrogen atmosphere for 48 h. After almost total solvent evaporation (2 mL remaining) and the addition of methanol (30 mL), the samples were centrifuged at 8000 rpm for 20 min at 25 °C and the supernatant was decanted. The nanoparticles (QD@Py) were dissolved in toluene (2 mL) and the purification process was repeated five times in order to eliminate the unreacted ligand.

Steady-state irradiations were performed with a LuzChem photo-reactor, using ten lamps emitting at 316 < λ < 400 nm, λ_{max} at 351 nm, 53 W m⁻².

Acknowledgements

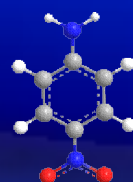
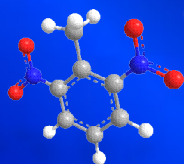
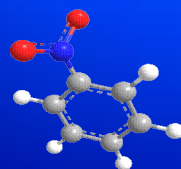
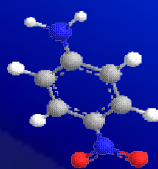
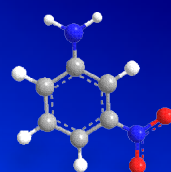
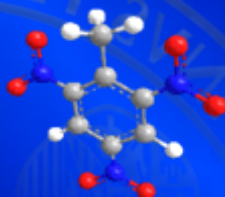
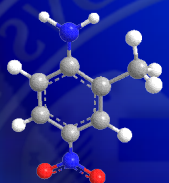
We thank MEC (Project CTQ2008-06777-CO2-01, contract granted to J.A.-S., and RyC contract granted to R.E.G), GVA (Project ACOMP/2009/334), and UVEG (Project UV-AE-09-5805) for their support.

Keywords: fluorescence · halogenated solvents · laser spectroscopy · pyrenes · steady-state photolysis

- a) C. Bohne, E. B. Abuin, J. C. Scaiano, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 4226; b) S. L. Murov, I. Carmichael, G. L. Hug in *Handbook of Photochemistry*, 2nd ed., Marcel Dekker, New York, **1992**.
- W. Chen, C. J. Durning, N. J. Turro, *Macromolecules* **1999**, *32*, 4151.
- N. Van Anh, F. Schlosser, M. M. Groeneveld, I. H. M. Stokkum, F. Würthner, R. M. Williams, *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 18358.
- A. B. Patel, P. Khumsupan, V. Narayanaswani, *Biochemistry* **2010**, *49*, 1766.
- B. Srinivas, C. J. Durning, N. J. Turro, *Macromolecules* **1996**, *29*, 5505.
- a) B. Schazmann, N. Alhashimy, D. Diamond, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 8607; b) S. H. Lee, S. H. Kim, S. K. Kim, J. H. Jung, J. S. Kim, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 9288; c) K.-S. Focsaneanu, J. C. Scaiano, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2005**, *4*, 817.
- A. S. Oliveira, L. F. Vieira Ferreira, J. P. Da Silva, J. C. Moreira, *Int. J. Photoenergy* **2004**, *6*, 205.
- Y.-P. Sun, B. Ma, G. E. Lawson, C. E. Bunker, H. W. Rollins, *Anal. Chim. Acta* **1996**, *319*, 379.
- P. Kubát, S. Civiš, A. Muck, J. Barek, J. Zima, *J. Photochem. Photobiol. A* **2000**, *132*, 33.
- C. A. Reyes, M. Medina, C. Crespo-Hernandez, M. Z. Cedeno, R. Arce, O. Rosario, D. M. Steffenson, I. N. Ivanov, M. E. Sigman, R. Dabestani, *Environ. Sci. Technol.* **2000**, *34*, 415.
- S. Yamada, H. Kuroki, M. Maeda, M. Takagi, T. Yamashita, *Microchem. J.* **1994**, *49*, 117.
- M. Amelia, A. Lavie-Cambot, N. D. McClenaghan, A. Credi, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 325.
- S. A. Tucker, L. E. Cretella, R. Waris, K. W. Street, Jr., W. E. Acree, Jr., J. C. Fetzer, *Appl. Spectrosc.* **1990**, *44*, 269.
- J. Shirdel, A. Penzkofer, R. Procházka, Z. Shen, J. Strauss, J. Daub, *Chem. Phys.* **2007**, *331*, 427.
- M. Sigman, P. Schuler, M. Ghosh, R. T. Dabestani, *Environ. Sci. Technol.* **1998**, *32*, 3980.
- M. Montalti, L. Prodi, N. Zaccheroni, R. Baxter, G. Teobaldi, F. Zerbetto, *Langmuir* **2003**, *19*, 5172.
- S. F. Wuister, C. de Mello Donegá, A. Meijerink, *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 17393.
- The Φ_f of pyrene in chloroform changes from 0.52 in deaerated to 0.04 in aerated solutions: J. Kollár, P. Hrdlovic, S. Chmela, *J. Photochem. Photobiol. A* **2010**, *214*, 33.
- Pyrene excimer decays by fluorescing, dissociating to the excited singlet state, and decaying to the triplet monomer and the ground state.
- T. Medinger, F. Wilkinson, *Trans. Faraday Soc.* **1966**, *62*, 1785.
- These values are close to those reported for pyrene and 1-methylpyrene radical cations in dichloromethane (see ref. [14]).
- A triplet quantum yield of 0.7 has been previously reported for N-acetyl-1-pyrenylmethylamine in dichloromethane, see: M. González-Béjar, A. Bentama, M. A. Miranda, S. E. Sitiba, J. Pérez-Prieto, *J. Org. Lett.* **2007**, *9*, 2067.
- W. L. F. Amarego, C. L. L. Chai, *Purification of Laboratory Chemicals*, 5th ed., Elsevier, Amsterdam, **2003**.
- T. Ohura, A. Kitazawa, T. Amagai, *Chemosphere* **2004**, *57*, 831.
- R. G. Harvey, M. Konieczny, J. Pataki, *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 2930.
- A solution of pyrene was irradiated for two hours and the photolysate was analyzed by GC/MS using an internal standard, the result of which is: pyrene (87.0%), I (2.6%), II (0.006%), III (2.8%), IV (6.1%), V (1.9%).
- The small amount of this compound and its instability in solution under ambient light made it impossible to obtain an adequate ¹³C NMR spectrum.
- S. Wen, J. Zhao, G. Sheng, J. Fu, P. Peng, *Chemosphere* **2003**, *50*, 111.
- D. S. Cordeiro, P. Corio, *J. Braz. Chem. Soc.* **2009**, *20*, 80.
- K. Miet, K. L. Menach, P. M. Flaud, H. Budzinski, E. Villenave, *Atmos. Environ.* **2009**, *43*, 3699.
- D. Bhattacharjee, K. Mukherjee, T. N. Misra, *J. Phys. Chem. Solids* **2000**, *61*, 751.
- C. Flors, S. Nonell, *Helv. Chim. Acta* **2001**, *84*, 2533.
- The phenalenone chromophore usually shows a quantum yield for triplet formation close to one.
- V. D. Knyazev, I. R. Slagle, *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102*, 1770.
- E. J. Bowen, K. K. Rohatgi, *Discuss. Faraday Soc.* **1953**, *14*, 146.
- Muonium is the single-electron atom with a positive muon as nucleus and can be considered as a light isotope of hydrogen.
- P. W. Percival, B. Addison-Jones, J. C. Brodovitch, K. Ghandi, J. Schüth, *Can. J. Chem.* **1999**, *77*, 326.
- R. H. Mitchell, Y. H. Lai, R. V. Williams, *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 4733.
- O. E. Zimmerman, R. G. Weiss, *J. Phys. Chem. A* **1999**, *103*, 9794.
- Traces of the potential 2-pyrenecarbaldehyde were also detected.
- T. Ogawa, Y. Tenkyuu, K. Nakashima, *Anal. Sci.* **2000**, *16*, 913.
- It has been demonstrated that singlet oxygen is not involved in the photochemical transformation of pyrene: see ref. [15] and M. Mazur, G. J. Blanchard, *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 1038.
- C. M. Smith, P. E. Savage, *Energy Fuels* **1992**, *6*, 195.
- S. I. Stoliarov, A. Bencsura, E. Shafir, V. D. Knyazev, I. R. Stagle, *J. Phys. Chem. A* **2001**, *105*, 76.
- a) J. Shirdel, A. Penzkofer, R. Procházka, J. Daub, E. Hochmuth, R. Deutzmann, *Chem. Phys.* **2006**, *326*, 489; b) M. P. Joshi, S. Raj Mohan, T. S. Dhami, B. Jain, H. Ghosh, T. Shripathi, U. P. Deshpande, *Appl. Phys. A* **2008**, *90*, 351; c) K. Iwata, *J. Raman Spectrosc.* **2008**, *39*, 1512; d) A. El-Agamey, M. Burke, R. Edge, E. J. Land, D. J. McGarvey, T. G. Truscott, *Rad. Phys. Chem.* **2005**, *72*, 341.
- W. W. Yu, L. Qu, W. Guo, X. Peng, *Chem. Mater.* **2003**, *15*, 2854.
- M. Grabolle, M. Spieles, V. Lesnyak, N. Gaponik, A. Eychmüller, U. Resch-Genger, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 6285.

Received: October 25, 2011

Published online on January 24, 2012



VNIVERSITAT [Logo] Facultat de Química
ID VALÈNCIA [Logo]

ICMol
INSTITUTO DE CIENCIA MOLECULAR

ID AGENCIV [Logo]
VALENCI [Logo]