

TRABAJO FIN DE MÁSTER
MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA
CURSO 2019-20
UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

**DESARROLLO DE UN SENSOR
FLUORESCENTE PARA LA DETECCIÓN DE
NITRO-EXPLOSIVOS, BASADO EN
NANOPARTÍCULAS DE POLÍMERO
CONJUGADO**

Autor: Naiara Larreina Vicente

Tutor académico: Carmen Reyes Mateo Martínez

Co-tutor: Yolanda Inmaculada Alacid Martínez

**INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN, DESARROLLO E INNOVACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA
SANITARIA DE ELCHE**

Grupo de investigación: Nanomateriales fluorescentes aplicados a sistemas biológicos.

Área de conocimiento: Química-Física

Dña Carmen Reyes Mateo Martínez, Catedrática del área de Química Física del Departamento de Agroquímica y Medio Ambiente de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

CERTIFICA

Que el presente trabajo titulado:

**“DESARROLLO DE UN SENSOR FLUORESCENTE PARA LA DETECCIÓN DE NITRO-EXPLOSIVOS,
BASADO EN NANOPARTÍCULAS DE POLÍMERO CONJUGADO”**

y que constituye la Memoria del Trabajo Fin de Máster en Biotecnología y Bioingeniería, que presenta:

NAIARA LARREINA VICENTE

ha sido realizado bajo su supervisión en el Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IDiBE), cumpliendo todos los requisitos necesarios.

Y para que así conste, se expide y firma el presente certificado en Elche a 31 de julio de 2020

Fdo.: Prof. C. Reyes Mateo

RESUMEN

En el presente Trabajo de Fin de Máster se ha desarrollado un sensor fluorescente basado en polímeros conjugados para la detección y posible discriminación de explosivos nitroaromáticos en medio acuoso. El sistema de detección se basa en la desactivación de fluorescencia diferencial producida por los distintos compuestos nitro-explosivos sobre nanopartículas fluorescentes, compuestas por polielectrolitos conjugados derivados del fluoreno, acoplados a vesículas lipídicas para su estabilización. Se han sintetizado nanopartículas de emisión en el azul y en el rojo, por separado y combinadas, optimizando la composición y características de las mismas para aumentar su sensibilidad a explosivos. Posteriormente, han sido inmovilizadas en una matriz sol-gel, para facilitar su manipulación.

Además, se ha explorado la potencial incorporación de un tercer polifluoreno con emisión en el verde para aumentar su especificidad. El sensor se ha puesto a punto utilizando el explosivo trinitrotolueno (TNT) y se ha probado también con alguno de sus derivados como el DNT, DNBA y DNFB, obteniéndose resultados prometedores para el desarrollo de un sensor de explosivos simple, específico, barato y sensible.

Palabras clave: sensor, desactivación de fluorescencia, nanopartículas fluorescentes, polímeros conjugados, sol-gel, nitro-explosivos.

ABSTRACT

In this Master's Degree Thesis, a fluorescent sensor based on conjugated polymers has been developed for the detection and possible discrimination of nitroaromatic explosives in aqueous solution. The detection system is based on the differential fluorescence quenching produced by the distinct nitro-explosive compounds on fluorescent nanoparticles, which are composed of fluorine derived conjugated polyelectrolytes, coupled to lipid vesicles for their stabilization. Nanoparticles of blue and red emission have been synthesized, separately and combined, after optimizing their composition and characteristics to increase the sensitivity to explosives. Subsequently, they have been immobilized in a sol-gel matrix, as a way to facilitate manipulation.

In addition, it has been explored the potential incorporation of a third polyfluorine with green emission to increase its specificity. The sensor has been developed using trinitrotoluene (TNT) and has also been tested with some of its derivatives such as DNT, DNBA and DNFB, obtaining promising results for the development of a simple, specific, cheap and sensitive explosives sensor.

Key words: sensor, fluorescence quenching, fluorescent nanoparticles, conjugated polymers, sol-gel, nitro-explosives.

ÍNDICE

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| RESUMEN | 3 |
| ABSTRACT | 3 |
| ÍNDICE | 4 |
| 1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES | 6 |
| 1.1. Detección de explosivos..... | 6 |
| 1.2. Compuestos nitroaromáticos..... | 7 |
| 1.3. Sensores ópticos de fluorescencia..... | 9 |
| 1.3.1 Sensores ópticos basados en <i>quenching</i> de fluorescencia..... | 9 |
| 1.3.2. Mecanismos de <i>quenching</i> en la detección de explosivos..... | 10 |
| 1.4. Polímeros conjugados fluorescentes (CPs)..... | 13 |
| 1.4.1 Sistemas basados en fluoreno..... | 14 |
| 1.4.2 Polielectrolitos sintetizados en el laboratorio para su uso como sondas fluorescentes..... | 14 |
| 1.5. Lípidos como base de sensores..... | 16 |
| 1.5.1 Acoplamiento polímero-vesícula lipídica..... | 18 |
| 1.6. Inmovilización sol-gel..... | 18 |
| 1.7. Sistema de detección a desarrollar..... | 20 |
| 2. OBJETIVOS..... | 22 |
| 3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL..... | 23 |
| 3.1. MATERIALES..... | 23 |
| 3.1.1. Polímeros conjugados fluorescentes..... | 23 |
| 3.1.2. Reactivos químicos..... | 23 |
| 3.1.3. Disolventes y otros productos comerciales..... | 23 |
| 3.1.4. Disoluciones..... | 23 |
| 3.2. MÉTODOS..... | 24 |
| 3.2.1. Preparación de nanopartículas fluorescentes (NPs)..... | 24 |
| 3.2.2. Técnica de sol-gel para la formación de monolitos..... | 25 |
| 3.2.3. Equipos de análisis y caracterización de nanopartículas fluorescentes..... | 26 |
| 3.2.4. Estudios de <i>quenching</i> | 27 |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 28 |
| 4.1. Selección y caracterización de nitro-explosivos..... | 28 |
| 4.2. Desarrollo y caracterización de NPs fluorescentes..... | 30 |
| 4.2.1 Caracterización de las NPs azules..... | 31 |
| 4.2.2. Estudio de desactivación de la fluorescencia en NPs azules por TNT..... | 35 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.3. Desarrollo y caracterización de NPs rojas..... | 38 |
| 4.3.1. Caracterización de NPs rojas..... | 39 |
| 4.3.2. Capacidad de detección de TNT de NPs fluorescentes rojas. | 40 |
| 4.4. Acoplamiento de NPs azules y rojas en el mismo sistema..... | 41 |
| 4.4.1. Optimización del sistema de NPs combinado..... | 42 |
| 4.4.2. Capacidad de detección de TNT del sistema de NPs combinado..... | 43 |
| 4.4.3. Aplicación del sensor en disolución para detección y discriminación de compuestos nitroaromáticos. | 44 |
| 4.5. Inmovilización de NPs en matriz sol-gel..... | 47 |
| 4.5.1. Caracterización de NPs azules, rojas y combinadas en monolitos sol-gel..... | 47 |
| 4.5.2. Aplicación del sensor inmovilizado: detección de explosivos. | 48 |
| 4.6. Incorporación del polímero verde. | 50 |
| 5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS | 52 |
| 6. BIBLIOGRAFÍA..... | 54 |

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

La detección de compuestos nitroaromáticos (NACs) como agroquímicos, reactivos y explosivos como el 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) o el 2,4-dinitrotolueno (DNT) en agua, es de gran relevancia, tanto para el mantenimiento de la salud pública como para la detección de bombas y minas submarinas (Liu et al., 2013; Toal et al., 2005). La contaminación de medios naturales con estos compuestos (Stenersen, 2004), catalogados como nitro-explosivos, se debe en gran parte a su elevado uso industrial, y además, por los cuantiosos residuos vertidos durante la II Guerra Mundial (Crosley et al., 2017).

De hecho, su presencia en suelos y medios marinos supone una gran amenaza para la salud pública, al relacionarse con patologías como la anemia, la carcinogenicidad, funcionamiento anormal del hígado, desarrollo de cataratas, irritación cutánea, etc. Estos síntomas pueden generarse en animales o humanos por exposición directa a corto o largo plazo a explosivos nitroaromáticos (Anderson et al., 2006; Ghasemi et al., 2019; Toal et al., 2005).

1.1. Detección de explosivos.

Los sistemas que se emplean actualmente para la detección de explosivos van desde el uso de perros entrenados, a técnicas específicas como la espectrometría de masas, sistemas cromatográficos, resonancia de plasmón superficial (SPR), métodos electroquímicos, inmunoensayos, etc. Todos estos métodos se consideran limitantes en muchas situaciones, bien por su alto coste o por no ser portables a cualquier lugar fuera del laboratorio.

La detección de explosivos en matrices acuosas resulta de gran importancia para la localización de minas subterráneas o contaminantes en medios marinos. A esta condición, además de complicar la detección, hay que sumarle el problema de que rara vez podemos encontrarlos en concentraciones saturadas, dada la gran dilución que sufren si se encuentran en mares u océanos. Por ello, tendrán que desarrollarse dispositivos lo suficientemente sensibles como para detectar trazas de explosivos para su aplicación real, lo que supone un gran reto. En este caso se pueden aplicar técnicas como el GC/LC-MS (Hakansson et al., 2000), espectrometría de movilidad iónica (IMS) (Khayamian et al., 2003), espectroscopía Raman (Sylvia et al., 2000), detección colorimétrica (Salinas et al., 2012; Toal et al., 2005) o electroquímica (Krausa et al., 1999), detección mediante técnicas de impresión molecular (MIP) (Edmiston et al., 2010), y métodos de apagamiento fotoluminiscente, más conocido como *quenching* de fluorescencia (Liu et al., 2013; Salinas et al., 2012; Sun et al., 2015; Toal et al., 2005).

De entre los distintos tipos de explosivos, los nitro-explosivos se caracterizan por ser fuertes desactivantes (*quenchers*) de la fluorescencia. Por ello, de entre las técnicas mencionadas anteriormente, la detección directa de NACs por métodos ópticos basados en ensayos de fluorescencia ofrece numerosas ventajas respecto al resto, dada su eficacia, alta sensibilidad, bajo coste y versatilidad, siendo por ello una de las tecnologías sensoras más establecidas (Kovalev et al., 2016).

Sin embargo, la mayoría de sistemas de este tipo presentan problemas de baja especificidad, ya que se basan, generalmente, en sistemas de transferencia inespecífica de electrones que no dependen de su exacta estructura molecular, sino de la conjugación de sus electrones. Además, al tratarse de muestras en agua, puede haber numerosos interferentes químicos contaminantes provenientes del ambiente que provean falsos positivos, o falsos negativos cuando los dispositivos no sean lo suficientemente sensibles. Una posible mejora de esta limitación es la combinación de sistemas fluorescentes cuyas propiedades fotofísicas se vean afectados de distinta manera por la presencia del explosivo, lo que permitirá aumentar su especificidad.

1.2. Compuestos nitroaromáticos.

Los NACs son protagonistas de una extensa bibliografía acerca de su toxicidad y potencial como contaminantes medioambientales, tanto por la reactividad derivada de su estructura química como por su uso extendido en diferentes industrias. A grandes rasgos, los fenómenos más significativos que se relacionan con este tipo de compuestos y alertan de su peligrosidad son la transferencia electrónica (ET), la formación de especies oxígeno reactivas (ROS) y el estrés oxidativo (OS) (Kovacic et al., 2014). Además, son extremadamente sensibles a la fricción e impacto en estado sólido, aunque esta explosividad se ve significativamente reducida cuando se encuentran en disolución.

Los compuestos que se emplean en el siguiente estudio, para su detección, se clasifican como nitroaromáticos, más concretamente como nitrobenzenos o derivados de ellos, siendo el TNT y el DNT los explosivos militares primarios y los principales componentes de minas sin explotar por todo el mundo (Kovacic et al., 2014). A continuación, se detallan sus principales características y se representa su estructura química en la figura 1.

➤ **TNT: 2,4,6-Trinitrotolueno** (CAS nº 118-96-7)

El TNT es un compuesto sólido de color amarillento y estructura cristalina que no se encuentra en la naturaleza. Químicamente, se caracteriza por tener una estructura central aromática derivada del benceno con tres grupos nitro y uno alcohol. Tiene una masa molecular de 227.13 g/mol y su

explosión se puede provocar por fricción o exposición a temperaturas mayores a 240° (Clayton et al., 1995). Se considera soluble en agua a una concentración de 115 mg/L a 23 °C o 0,5 mM (Phelan et al., 2001) y en numerosos solventes orgánicos como el cloroformo, tolueno, bencenos, etc., a concentraciones mayores (Clayton et al., 1995; Ryon et al., 1990).

➤ **DNT: 2,4-Dinitrotolueno** (CAS n° 121-14-2)

El DNT es un compuesto nitroaromático explosivo de 182.3 g/mol de peso molecular con una estructura similar al TNT, pero con 2 grupos nitro. A temperatura ambiente presenta un estado sólido cristalino amarillento, y explota a 169 °C. Se considera tóxico por inhalación, ingestión o absorción cutánea y farmacológicamente está clasificado como un carcinógeno, ya que aumenta el riesgo de neoplasmas en humanos o animales. Es insoluble en agua, soluble en etanol, cloroformo, benceno y etil-éter y muy soluble en acetona y piridina, además de otros disolventes orgánicos (Haynes, 2010).

➤ **DNFB: 2,4-dinitro-1-fluorobenceno** (CAS n° 70-34-8)

El 2,4-dinitro-1-fluorobenceno es un compuesto organofluorado de 186.1 g/mol compuesto por un anillo aromático hidrocarbonado (benceno) con un sustituyente de flúor y dos grupos nitro. Es considerado altamente tóxico, ya que es un potente irritante de ojos y piel, y explota a partir de 112.8 °C o al reaccionar con agentes reductores, especialmente en presencia de grupos nitro (Institute of Environmental Health Sciences, 1992). Su solubilidad en agua es muy baja; medida experimentalmente se considera de 400 mg/L a 25°C (Hendricks, 1983), y sí presenta buena solubilidad en disolventes orgánicos como el benceno, los éteres y el propilenglicol (O'Neil, 2006). También lo es en etanol y algo menos en cloroformo (Haynes, 2010).

➤ **DNBA: ácido 3,5-dinitrobenzoico** (CAS n° 99-34-3)

El ácido 3,5-dinitrobenzoico pertenece a la clase de los ácidos benzoicos, donde los hidrógenos en posiciones 3 y 5 están sustituidos por grupos nitro. Tiene un peso molecular de 212.2 g/mol, funde a 206 °C y ebulle a 395 °C. Su solubilidad en agua es próxima al 0,01 M y es buena en disolventes orgánicos.

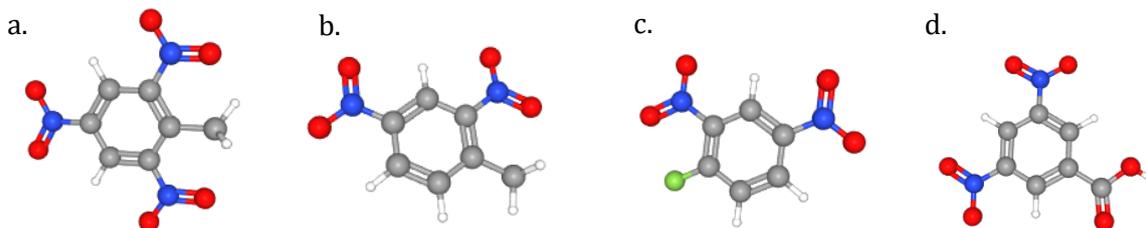


Figura 1. Estructuras químicas en 3D del (a.) TNT, (b.) DNT, (c.) DNFB y (d.) DNBA.

1.3. Sensores ópticos de fluorescencia.

Los sensores químicos son aquellos dispositivos que, tras reconocer el analito, transforman una información química en una señal medible y representativa de alguna característica del medio. La molécula sensora está formada por dos subgrupos: la unidad receptora, capaz de interactuar con la molécula a analizar selectivamente, y una unidad indicadora o transductora de la señal, que aporta la información medible mediante la variación de una propiedad macroscópica cuantificable. En el caso de los sensores ópticos (fig. 2), esta propiedad puede ser el color, la intensidad de fluorescencia, posición del espectro, etc. Esta interacción puede ser reversible y selectiva (sensor químico) o irreversible (dosímetro químico), aunque dado el interés industrial en obtener una información cuantificable, en el concepto de sensor químico va intrínseca dicha característica. Otro de los factores fundamentales en este tipo de dispositivos es que sean selectivos y sensibles, es decir, que su umbral de detección de analito sea bajo y específico, ya que es así como encontramos las moléculas a analizar en la naturaleza (Vallejos, 2014).

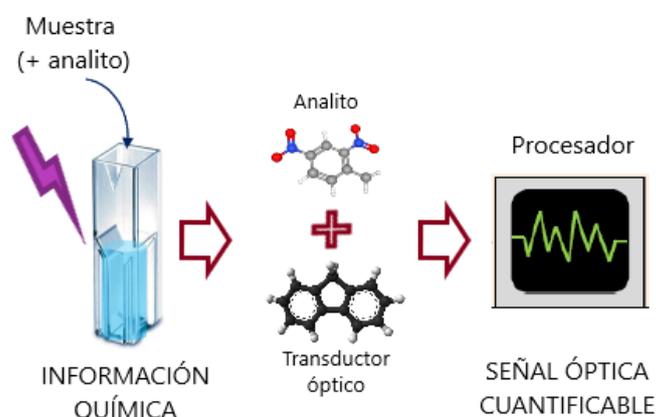


Figura 2. Esquema representativo del funcionamiento de un sensor óptico.

Dada la naturaleza no fluorescente de los explosivos, la detección basada en cambios en la señal de fluorescencia es un método indirecto que usa fluoróforos o materiales sensibles a fluorescencia que sufren cambios en la dicha propiedad mediante la interacción con explosivos. Cualquier cambio en este sentido, ya sea de apagamiento o aumento de intensidad, longitud de onda, anisotropía o tiempo de vida puede servir como sensor de explosivos por su relación con la concentración y tiempo de exposición al explosivo (Sun et al., 2015).

1.3.1 Sensores ópticos basados en *quenching* de fluorescencia.

Los compuestos nitroaromáticos son buenos desactivantes de fluorescencia ante fluoróforos comunes, mediante mecanismos que se detallan en el apartado 1.3.2., aunque este apagamiento o

quenching siempre será más notable frente a fluoróforos con alto rendimiento cuántico y cuya interacción con el analito forme complejos donante-aceptor estables (Kovalev et al., 2016). Existen numerosos estudios que presentan dispositivos híbridos, combinando un elemento sensor fluorescente con otros materiales como membranas, fibras, matrices o nanopartículas (Dhandole et al., 2018; Ghasemi et al., 2019; Salinas et al., 2012; Sandhu et al., 2015). Uno de los elementos fluoróforos que ha obtenido buenos resultados son los derivados de pireno, el cual podemos encontrar en forma de ácido piren-1-butírico en combinación con materiales como la membrana de triacetato de celulosa para la detección de TNT y DNT en aguas subterráneas (Seitx, 1990), o ligado covalentemente a una superficie cristalina, formando una monocapa sensora en agua y vapor (Ding et al., 2012).

Los puntos cuánticos o *Quantum Dots* (QD), también se han probado como sensores para detección de explosivos. En un estudio de Ghasemi et al. se emplearon QD de CdTe de emisión azul, en combinación con otros de emisión en amarillo y rojo siendo capaces de discriminar distintos NACs en concentraciones del rango de 5.0 – 200.0 $\mu\text{mol/L}$ (Ghasemi et al., 2019).

Otro elemento que se utiliza ampliamente como sensor químico son los polímeros conjugados fluorescentes (CPs). Aunque nos adentraremos en cuestiones teóricas más adelante, puesto que se trata del método de detección que se utiliza en este TFM, numerosos estudios avalan la eficacia de los CPs para la identificación de nitro-explosivos (Chang et al., 2004; Malik et al., 2015; Shaw et al., 2017). Estos polímeros pueden presentarse en forma de delgadas membranas o films (Chang et al., 2004), rodeando nanopartículas o formando dendrímeros (Malik et al., 2015), entre muchas otras opciones, y muestran generalmente una alta sensibilidad frente a los mencionados analitos, indicando su potencial para la detección de explosivos *in situ* (Chang et al., 2004; Malik et al., 2015).

1.3.2. Mecanismos de *quenching* en la detección de explosivos.

Dentro de las técnicas de detección de explosivos mediante sensores químicos, destacan aquellas basadas en *quenching* de fluorescencia, debido a la fuerte capacidad desactivante de los NACs, mencionada anteriormente. Este tipo de dispositivo será el desarrollado en el presente TFM.

El proceso de *quenching* tiene lugar por interacción entre el fluoróforo (el polímero conjugado, en nuestro caso) y el agente desactivante o *quencher* (el explosivo). Este contacto puede darse por difusión o colisión, en cuyo caso correspondería a un fenómeno de *quenching* dinámico, o resultar de la formación de un complejo donante-aceptor, correspondiente al *quenching* estático (Sun et al., 2015). El *quenching* estático prevalece sobre el dinámico en la detección de explosivos, y la constante de asociación del complejo formado puede ser estimada a partir de la disminución de la intensidad de fluorescencia, utilizando la ecuación de Stern-Volmer, (ec. 1 en Materiales y Métodos)

(Sun et al., 2015). Dicha constante, conocida como constante de Stern-Volmer (K_{SV}) informa sobre la eficiencia del *quenching*, de forma que cuanto mayor es su valor, más capacidad tiene el *quencher* para desactivar al fluoróforo, lo que se traduce en una mayor sensibilidad en la detección.

El mecanismo por el cual la formación del complejo ocasiona una pérdida de la señal fluorescente, suele deberse a procesos de transferencia entre las especies que lo forman: transferencia electrónica fotoinducida (PET, *Photoinduced Electron Transfer*), transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET, *Förster Resonance Energy Transfer*), desactivación por transferencia de energía (ETT; *Electronic Energy Transfer*), transferencia de cargas intermoleculares (ICT, *Intermolecular Charge Transfer*), etc. (Sun et al., 2015). En el caso particular de los polímeros conjugados, trabajos previos han descrito que cuando interactúan con explosivos nitroaromáticos, son los procesos de PET los que mayoritariamente originan el apagamiento de la fluorescencia (Chang et al., 2004; Chen et al., 2010).

Muchos explosivos son compuestos orgánicos altamente nitrados, lo cual les confiere la propiedad de ser electrón-deficientes. Por otro lado, los CPs, son moléculas con alta capacidad para donar electrones por la alta conjugación de su estructura electrónica. La deficiencia electrónica de los explosivos, entre los que se incluyen los que se utilizan en el presente estudio, los hacen propensos a interactuar con fluoróforos ricos en electrones mediante uniones de tipo donador-aceptor, siendo el polímero conjugado el donador o anfitrión, y los explosivos el aceptor o huésped de electrones.

En la transferencia de electrones fotoinducida, el estado excitado del fluoróforo (LUMO) es propenso a donar un electrón al estado de más baja energía (HOMO) del compuesto huésped, que a su vez se encuentra por encima del estado fundamental HOMO del polímero, como describe la imagen (fig. 3). La fuente de energía proveniente de un fotón genera el salto del electrón al estado excitado, el cual en vez de retroceder al estado fundamental emitiendo energía de forma radiante, saltará al orbital desocupado del explosivo. A continuación regresará al estado fundamental del polímero mediante un proceso no radiativo, dando lugar al amortiguamiento de la fluorescencia neta (Sun et al., 2015).

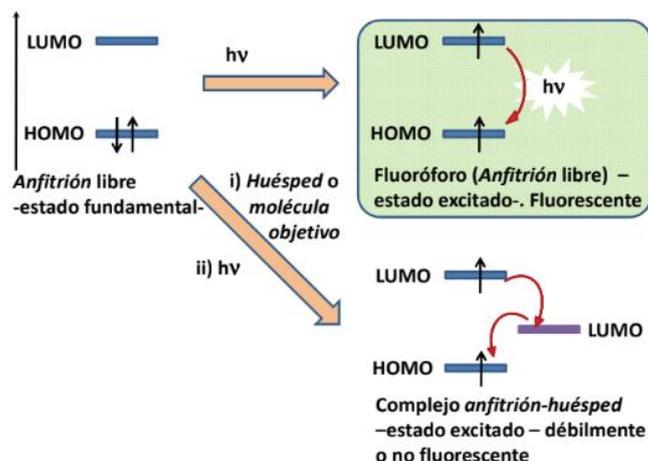


Figura 3. Esquema del mecanismo de transferencia de energía fotoinducida entre el anfitrión (polímero fluorescente) y el huésped (nitro-explosivo). Imagen tomada de: (Haynes, 2010).

Por lo tanto, este complejo de interacción que se dará individualmente entre macromoléculas, se verá plasmado en la fluorescencia total de la muestra radiada mediante un fenómeno de *quenching*, que dependerá a su vez de la concentración de explosivo en el medio, además de otros factores como la difusión de moléculas en el medio, la temperatura, o la estabilidad del polímero. La figura 4 muestra de forma esquemática la reducción de fluorescencia por PET que se produce al interactuar el nitro-explosivo con el polímero conjugado.



Figura 4. Esquema representativo de la transferencia de energía fotoinducida entre una molécula derivada de fluoreno y un compuesto nitroaromático (TNT). Imagen modificada de: (Sun et al., 2015)

Aunque la sensibilidad de detección es alta, pues la disminución de fluorescencia se empieza a observar a muy bajas concentraciones de explosivo, la selectividad del método es bastante deficiente, dado que no es capaz de distinguir si la pérdida de señal es debida al explosivo o a cualquier otra sustancia con capacidad desactivante. Por otro lado, no permite distinguir entre distintos explosivos si únicamente se emplea un polímero. Sin embargo, con objeto de superar esta limitación, la idea es caracterizar la interacción con distintos polímeros combinados y crear así un patrón diferencial de reconocimiento. Estos polímeros deberán presentar espectros de emisión bien diferenciados y, a ser

posible, ser excitados en la misma longitud de onda simultáneamente. Por otro lado, lo ideal es que puedan ser inmovilizados en un mismo dispositivo que permita su manipulación o incluso su reutilización.

1.4. Polímeros conjugados fluorescentes (CPs).

Los CPs son materiales fluorescentes con propiedades beneficiosas para su uso como sensores y biosensores, tales como la no-toxicidad, estabilidad, y alta sensibilidad. Recientemente han empezado a usarse como detectores de explosivos con resultados exitosos (Lasic, 1990; Rubio-Camacho et al., 2019) y, comparados con pequeñas moléculas sensoras, poseen una mayor eficiencia de comunicación electrónica entre fluoróforo y *quencher* a lo largo de toda la cadena polimérica.

En general, se caracterizan por tener una buena fotoestabilidad y poder realizar un autoensambaje espontáneo mediante interacciones reversibles con otras especies, que resultan en estructuras supramoleculares con propiedades ópticas muy interesantes. Pueden contener, además, cadenas laterales que permiten su solubilización y los hacen fácilmente accesibles para su bioconjugación con elementos de reconocimiento, lo que resulta de gran interés para aplicaciones basadas en detección. A los CPs que presentan cadenas laterales con grupos polares o iónicos se le conoce como polielectrolitos conjugados (CPEs).

Los CPEs son excelentes donadores de electrones debido a la presencia de sistemas de electrones π con facilidad para deslocalizarse, promoviendo la interacción electrostática entre el polímero y el nitroaromático electrón-deficiente. Presentan, por ende, una alta capacidad de absorción y eficiencia, tanto en fotoluminiscencia como electroluminiscencia, y los grupos iónicos laterales facilitan su solubilización en medio acuoso (Sun et al., 2015).

En cuanto a su eficacia como fluoróforos, Swager et al. (Swager, 1998) propusieron que el buen funcionamiento de las cadenas poliméricas en comparación a moléculas fluorescentes independientes se debe a un efecto que denominaron “*molecular wire*” (cable molecular), o “*one point contact, multi-point response*” (contacto en un punto, respuesta multi-punto). Este efecto se puede describir como el resultado de apagamiento eficiente de todas las unidades emisoras de un polímero conjugado por la unión de una molécula de analito a un solo receptor (fig. 5).

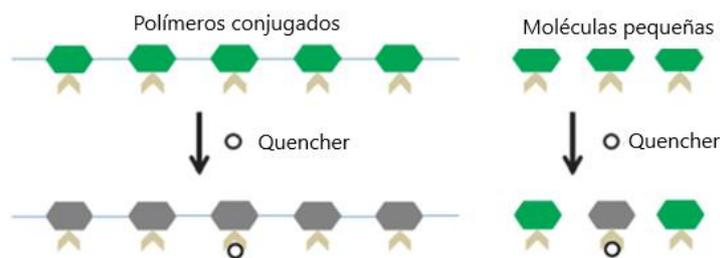


Figura 5. Ilustración esquemática del efecto “cable molecular”. Imagen modificada de (Sun et al., 2015).

1.4.1 Sistemas basados en fluoreno.

El fluoreno es un hidrocarburo policíclico aromático caracterizado por su fluorescencia violeta y su uso como precursor de otros compuestos de interés como polifluorenos, polímeros conductores y electroluminiscentes o membranas para celdas de combustible. En el ámbito de los sensores, solemos encontrar derivados del fluoreno en polielectrolitos conjugados por su reactividad química. Su fácilmente modificable estructura permite la introducción de especies activas para la obtención de estructuras bioconjugadas con diseños específicos (Vallejos, 2014).

Los CPEs con sistemas basados en fluoreno están compuestos por una estructura base rígida e hidrofóbica de polifluoreno con cadenas laterales cargadas flexibles, que inducen un comportamiento de agregación y le confieren cierta solubilidad en medio acuoso. El fenómeno de agregación influye directamente en su fluorescencia intrínseca, de modo que las lecturas de fluorescencia obtenidas pueden ofrecer información adicional sobre el comportamiento del polímero en su interacción con otras biomoléculas. Estos CPEs presentan, además, altos rendimientos cuánticos y fotoestabilidad en disolución y poseen amplios anchos de banda en el azul, lo cual es ideal para experimentos de transferencia de energía, ya que es la franja más energética (Kahveci et al., 2014).

1.4.2 Polielectrolitos sintetizados en el laboratorio para su uso como sondas fluorescentes.

El polielectrolito catiónico *poly{[9,9-bis(6'-N,N,N-trimethylammonium)hexyl]fluorene-phenylene}bromide* (HTMA-PFP) (fig. 6), sintetizado en el laboratorio, es un polifluoreno soluble en agua, con emisión en el azul y compuesto por una estructura rígida central derivada de fluoreno y aminas cuaternarias, como parte de la carga catiónica responsable de las interacciones electrostáticas. La estructura catiónica y los anillos hidrofóbicos permiten que el polielectrolito establezca interacciones inespecíficas con especies de carga opuesta. Un estudio llevado a cabo por miembros del laboratorio, demuestra la accesibilidad de este polímero a vesículas compuestas por fosfolípidos

aniónicos y zwitteriónicos, concluyendo con su rápida incorporación en la membrana y una alta afinidad por la bicapa lipídica, donde muestra una mayor intensidad de fluorescencia y estabilidad (Kahveci et al., 2013).

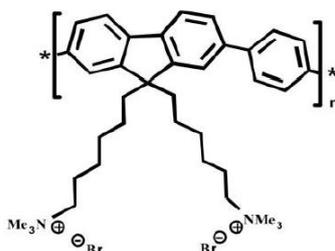


Figura 6. Estructura química unitaria del polielectrolito HTMA-PFP. Imagen tomada de: (Kahveci et al., 2014)

Por otro lado, en el laboratorio también se han sintetizado otros dos polímeros de estructura similar, con copolímeros añadidos que desplazan la emisión hacia mayores longitudes de onda (Kahveci et al., 2016; Vázquez-Guilló et al., 2018): un polifluoreno con fluorescencia en el verde (*copoly-((9,9-bis(60-N,N,N-trimethylammonium)hexyl)-2,7-(fluorene)-alt-4,7-(2-(phenyl)benzo(d)(1,2,3) triazole)) bromide*: HTMA-PFBT) y otro con fluorescencia en el rojo (*copoly-((9,9-bis(60-N,N,N-trimethylammonium)hexyl)-2,7-(fluorene)-alt-1,4-(naphtho(2,3c)-1,2,5-thiadiazole)) bromide*: HTMA-PFNT). Estos dos polifluorenos han sido menos caracterizados y serán probados en este TFM, junto con el azul, como sensores de nitro-explosivos, para aumentar la información obtenida y optimizar el dispositivo. De ellos se conoce que también presentan afinidad por vesículas lipídicas, aunque tienen un menor rendimiento cuántico, sobre todo el rojo, por lo que se necesitarán concentraciones más altas y una mayor apertura de rendijas para la medición de su fluorescencia.

La combinación de polifluorenos que emiten en distintos rangos espectrales puede aumentar la especificidad cuando se quieren utilizar como sensores ópticos. En la figura 7 se recogen, además de las estructuras químicas de los tres polielectrolitos, sus espectros de absorción, donde se observa que existen longitudes de onda comunes a las que pueden ser excitados simultáneamente. Por tanto, una vez optimizadas las condiciones, debería ser posible recoger las tres bandas de emisión en un solo espectro, y estudiar la distinta influencia que ejercen los nitroaromáticos sobre cada una de ellas.

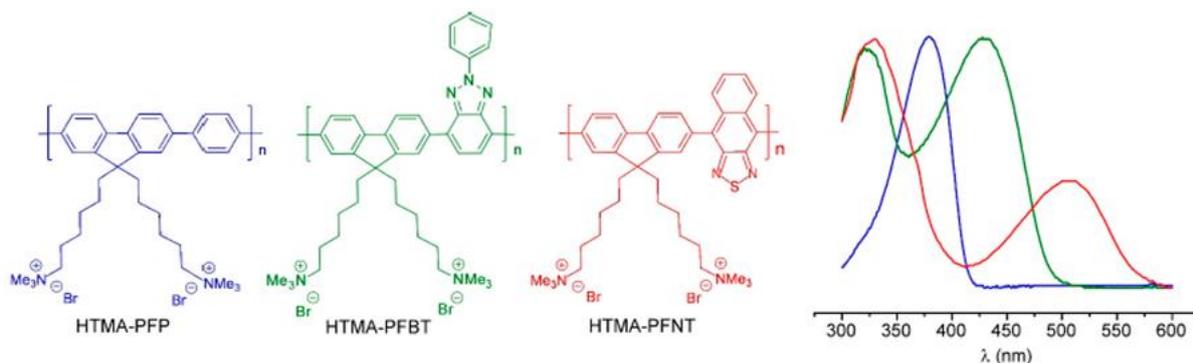


Figura 7. Estructuras químicas y espectros de absorbancia normalizados de los CPEs HTMA-PFP (azul), HTMA-PFBT (verde) y HTMA-PFNT (rojo). Imagen modificada de (Rubio-Camacho et al., 2019).

1.5. Lípidos como base de sensores.

Las vesículas lipídicas se caracterizan por su alta biocompatibilidad y capacidad de bioconjugación con otros compuestos, lo cual las hace muy versátiles. La naturaleza bipolar de los lípidos que las componen permite su estabilidad en soluciones acuosas, a la vez que pueden solubilizar o interactuar con especies hidrofóbicas al integrarlas en su estructura. Las vesículas lipídicas se pueden clasificar en cuatro grupos dependiendo de su tamaño y estructura membranosa (fig. 8). Se denominan MLVs (*Multi-lamellar vesicles*) aquellas vesículas formadas por varias bicapas lipídicas concéntricas con un tamaño entre 1 – 5 μm . Por otro lado, se clasifican como LUVs (*Large Unilamellar Vesicles*) aquellas vesículas entre 100 – 250 nm con una sola bicapa lipídica, SUVs (*Small Unilamellar Vesicles*) las vesículas unilamelares con un tamaño entre 20 – 100 nm y GUVs (*Giant Unilamellar Vesicles*), las vesículas gigantes con tamaños de micras (Lasic, 1990). En este trabajo se tratarán de obtener partículas cercanas a 100 – 150 nm, por lo que se podrían clasificar como LUVs, y entrarían así dentro de la categoría que se conoce como nanopartícula.

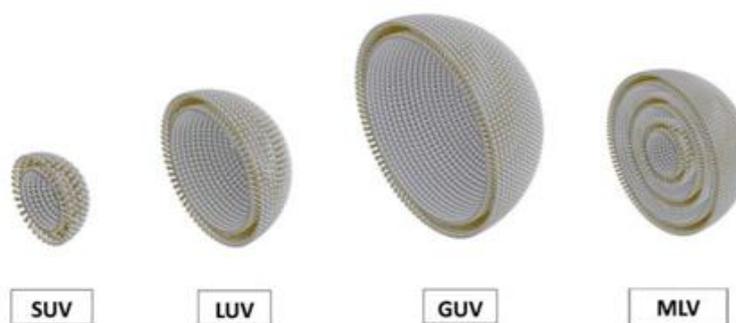


Figura 8. Clasificación de vesículas lipídicas según tamaño y estructura lamelar.

Las LUVs se caracterizan por estar compuestas por una única bicapa lipídica con un interior acuoso, al igual que una membrana celular. Esta organización se da espontáneamente gracias a las propiedades químicas de las moléculas que lo forman, los fosfolípidos. Las cabezas polares interaccionan entre ellas organizándose de manera que quedan en contacto con el agua, mientras que las colas hidrocarbonadas se disponen hacia el interior e interaccionan con la capa interior, formando una esfera. Las especies cargadas pueden interaccionar con la superficie de la vesícula e incorporarse entre las cabezas polares en contacto con la fase acuosa, mientras que las más hidrofóbicas se adentrarán en la bicapa lipídica.

El acoplamiento de polímeros a las vesículas lipídicas, como el polietilenglicol, es un método generalmente utilizado para aumentar su estabilidad, ya que las LUVs tienden a agregar y fusionarse con el tiempo, dando lugar a la formación de MLVs y aumentando considerablemente su tamaño. Sin embargo, en algunos casos, como el de la interacción con polímeros conjugados, la estabilización es mutua, beneficiando especialmente a la estabilidad del polímero en disolución, y potenciando sus propiedades ópticas. Por ello, la formación de nanopartículas basadas en este acoplamiento, contribuirá en la formación de un sistema sensor perfectamente estable, al dotar de fluorescencia a la vesícula lipídica.

La superficie en contacto con la interfase acuosa puede presentar distintos grupos moleculares que le confieren características electrostáticas específicas; así, los fosfolípidos que las forman pueden clasificarse como aniónicos/catiónicos o zwitteriónicos, siendo estos últimos los más sensibles a la agregación. Estos factores tendrán que tenerse en cuenta a la hora de escoger tanto el lípido que componga las nanopartículas como las condiciones de preparación e incubación de las mismas con el polímero fluorescente.

Los fosfolípidos que se prueban en este estudio son la L- α -fosfatidilcolina de huevo (PC), y el dioleoil-fosfatidilglicerol (DOPG). Las fosfatidilcolinas son una clase de fosfolípidos zwitteriónicos que incorporan la colina (amina cuaternaria y grupo fosfato) y el glicerol como cabeza polar, unido a dos cadenas de ácidos grasos que varían en longitud y número de insaturaciones. Son lípidos que fácilmente forman bicapas lipídicas y poseen la cabeza polar más común en membranas de mamíferos. Por otro lado, el DOPG es un lípido aniónico que compone en un menor porcentaje las membranas biológicas. No posee ningún grupo en la cabeza polar a parte del fosfato, lo que confiere una carga neta negativa a la superficie membranosa (Yeagle et al., 2016). Está unido a dos cadenas de ácidos grasos de 16 carbonos, cada una de ellas con una insaturación. Las distintas características electrostáticas de ambos fosfolípidos producirán interacciones diferenciales tanto con el polímero como en la propia formación de la vesícula lipídica. Por ello, se estudiará el tamaño de partícula que se

obtiene, su estabilidad en disolución coloidal, nivel de agregación e interacción con el polímero, así como su efectividad para componer el sensor.

1.5.1 Acoplamiento polímero-vesícula lipídica.

Estudios previos llevados a cabo con el polímero HTMA-PFP (Kahveci et al., 2014), muestran las ventajas de combinar el polielectrolito con vesículas lipídicas por su aumento de fluorescencia y fotoestabilidad, en comparación con el polielectrolito disuelto en tampón. El bajo rendimiento cuántico y el desplazamiento del espectro de emisión hacia el rojo que presenta este polielectrolito en tampón se atribuye a la formación de agregados metaestables por autoensamblaje de las cadenas hidrofóbicas del polímero y a las interacciones electrostáticas inespecíficas entre agregados y especies aniónicas del tampón. La incorporación del polímero en las bicapas lipídicas de las LUVs lo estabiliza en disolución, formando nanopartículas que impiden su agregación y aumentan su señal de fluorescencia.

La interacción y la localización final del polielectrolito en la bicapa depende de la naturaleza lipídica de las vesículas, penetrando en el núcleo hidrofóbico en el caso de las aniónicas y quedando más hacia la superficie y más agregado, en el caso de las zwitteriónicas (fig. 9) (Kahveci et al., 2014). Estas características podrían afectar a la detección de los nitro-explosivos, por lo que se espera obtener una capacidad de detección distinta dependiendo de la composición lipídica de la nanopartícula.

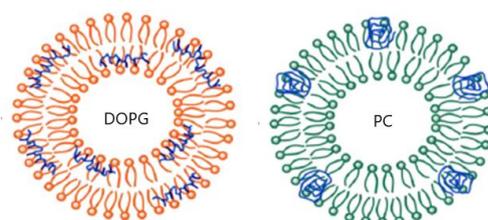


Figura 9. Modelo esquemático de acoplamiento del polímero HTMA-PFP en LUVs de DOPG y PC. Modificada de: (Kahveci et al., 2014).

1.6. Inmovilización sol-gel.

Siendo el principal problema de los sensores ópticos su estabilidad y mantenimiento de la fotoluminiscencia, el recubrimiento de las vesículas con el polímero que actúa como sonda fluorogénica es una opción muy válida. Sin embargo, la mayoría de sensores ópticos se encuentran acoplados a materiales que los inmovilizan, bien en tiras, membranas o en matrices sólidas. La inmovilización en este tipo de matrices aporta numerosas ventajas en comparación con las nanopartículas en disolución coloidal, que incluyen la portabilidad, la estabilización de la señal y la

reutilización del dispositivo, algo que habrá que estudiar ya que depende de la reversibilidad de interacciones analito-polímero (Crosley et al., 2017).

Sin embargo, la inmovilización de las nanopartículas en una matriz significa un mayor reto, ya que las condiciones que se habrían optimizado en disolución deben adaptarse a esta nueva situación, para paliar las restricciones en la difusión del analito y en la sensibilidad del sistema.

Las matrices monolíticas de sílice, basadas en el proceso sol-gel, son unas de las más empleadas en el desarrollo de dispositivos sensores (Dunn et al., 1991; Leca-Bouvier et al., 2014; Leong et al., 2018). Esta clase de materiales porosos permiten retener las propiedades ópticas y capacidad de interacción de las nanopartículas, ya que proporcionan una estructura sólida que se mantiene hidratada, sin interferir con ellas más que en su mero soporte. Por otro lado, este tipo de vidrios minimizan la dispersión de la luz y los efectos de absorción ya que son transparentes a longitudes de onda mayores de 300 nm, siendo ideales para sensores basados en la transducción óptica (Dunn et al., 1991). Los aerogeles de sílice son extremadamente porosos (hasta un 98 %) y por tanto presentan una gran área superficial ($\sim 1600 \text{ m}^2/\text{g}$) (Wagh et al., 1999). Las especies a inmovilizar quedan retenidas en un microambiente acuoso entre los poros de la matriz de sílice, permitiendo la difusión y acceso de analitos presentes en la muestra a analizar. El tamaño de poro y el del analito influirán en su velocidad de difusión a través de la matriz, además de las interacciones que pueden darse entre el analito y la propia matriz hidratada. Sin embargo, al actuar la matriz como un mero soporte, no se espera que surja ninguna interacción entre estos elementos, permitiendo la correcta interacción del analito con el sensor (Dave et al., 1994).

En la figura 10 vemos un esquema de cómo sería el proceso de atrapamiento de nanopartículas fluorescentes, o cualquier otra macromolécula, entre los poros de la matriz, gracias a la polimerización *in situ* de la matriz sol-gel en la disolución donde se encuentran suspendidas.

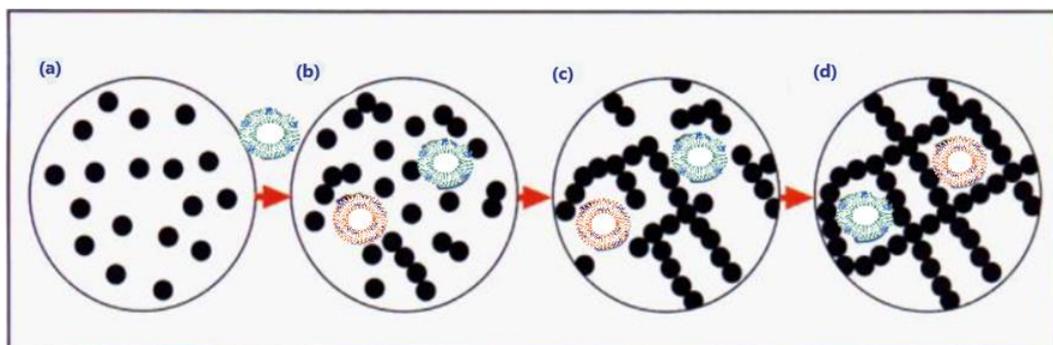


Figura 10. Atrapamiento de nanopartículas durante el proceso sol-gel (a) Formación de partículas de sol durante la hidrólisis inicial y policondensación. (b) Adición de la nanopartícula al sol. (c) La creciente red de sílice comienza a atrapar las nanopartículas. (d) Las nanopartículas quedan atrapadas en los poros de la matriz. Modificado de: (Ellerby et al., 1992).

Concretamente, la matriz generada con el precursor tetraetoxisilano (TEOS) empleada en este estudio, entra dentro del grupo de los tetralcoxisilanos, ampliamente empleados como material de base para la preparación de aerogeles de sílice. La decisión de elegir el TEOS antes que el otro precursor más común, tetrametiloxisilicato (TMOS), para sintetizar la matriz, se ha tomado mayormente por una razón de precio (unas 5 veces menor) y por seguridad, ya que el TMOS puede generar vapores que causen ceguera. Por otra parte, los aerogeles basados en TEOS en presencia de un catalizador ácido a menudo presentan mayor tiempo de gelificación (en este caso 48 horas), mayor pérdida de volumen (~30 %), menor transmisión óptica (~65 %) y mayor densidad (~0,2 g/cm³) (Venkateswara Rao et al., 2004). Por otro lado, el grupo de investigación tiene una larga trayectoria con el uso y estudio de este tipo de matrices para inmovilización de dispositivos sensores (Kahveci et al., 2017). La figura 11 muestra un esquema de lo que sería la matriz de TEOS con las nanopartículas lipídicas fluorescentes de polímero conjugado, que denominaremos NPs, incluidas en sus poros.

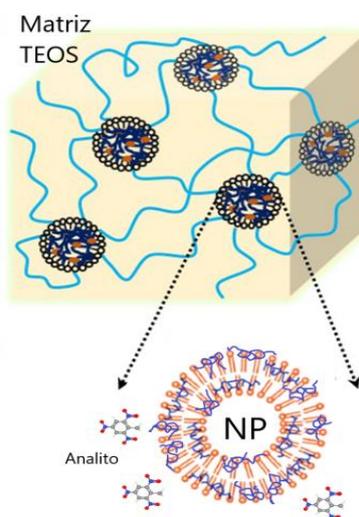


Figura 11. Esquema de una matriz de sílice conteniendo NPs atrapadas en su interior. Imagen modificada de (Wang et al., 2018).

1.7. Sistema de detección a desarrollar.

Teniendo en cuenta todos los puntos mencionados anteriormente, en el presente estudio se pretende desarrollar un sensor de nitro-explosivos basado en la desactivación de la fluorescencia usando como base NPs que emiten en colores distintos, con el fin de añadir selectividad al sensor, teniendo en cuenta que la señal de cada fluoróforo puede verse afectada de diferente manera por el analito. La idea es optimizar el protocolo de síntesis para cada polímero por separado y, a continuación, tratar de combinar tanto las condiciones de síntesis como de medición para verificar que es lo suficientemente sensible para identificar y cuantificar el explosivo que se está analizando. En un principio se planteará la combinación de los polímeros azul (HTMA-PFP) y rojo (HTMA-PFNT), y

como posible incorporación se estudiará el acoplamiento del verde (HTMA-PFBT). El dispositivo se pondrá a punto centrándose en la detección de TNT y posteriormente se incluirá la respuesta del sensor frente al resto de NACs.

El objetivo final es obtener un dispositivo eficiente, sensible, específico, portable, y reutilizable, por lo que será necesario inmovilizarlo en una matriz sol-gel. En este estudio la detección de explosivos se realizará por separado y en agua mili-Q, pero en un futuro se pretende estudiar su eficiencia en muestras reales de agua dulce y salada, combinando más de un analito, con interferentes contaminantes, e incluso con explosivos en vapor, para comprobar su posible aplicación en la industria. La figura 12 muestra el esquema de lo que sería el mecanismo de funcionamiento del dispositivo, que incluye NPs de emisión en distintos colores inmovilizadas en una misma matriz, y cuya fluorescencia se verá afectada por la presencia de los nitro-explosivos.

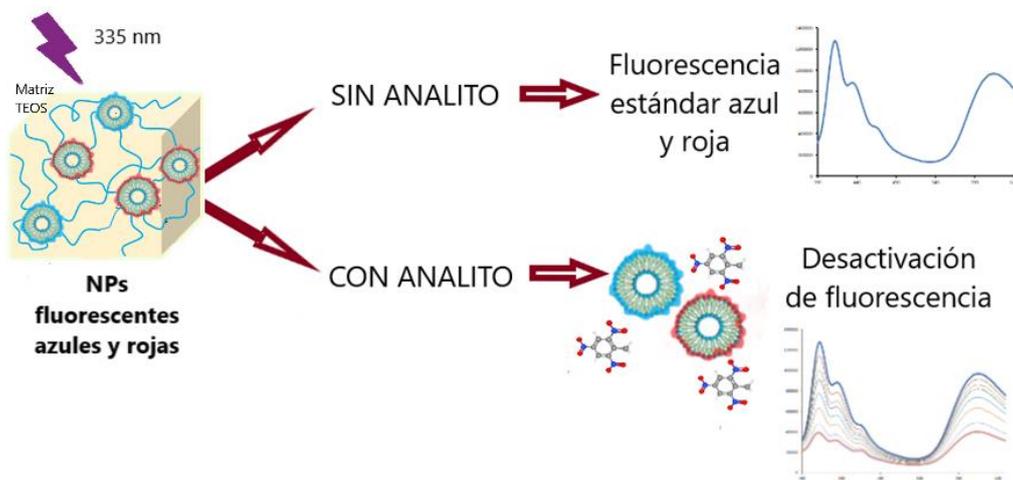


Figura 12. Mecanismo de funcionamiento del sensor a desarrollar.

2. OBJETIVOS

El objetivo principal del presente Trabajo de Fin de Máster es el desarrollo de un sensor fluorescente basado en polímeros conjugados, estabilizados en vesículas lipídicas, que permita la identificación y discriminación de nitro-explosivos en soluciones en las que éstos se encuentren a bajas concentraciones. Además, se busca que el sensor sea eficiente, sensible, selectivo y portable.

Este objetivo principal se puede dividir en los siguientes objetivos específicos:

- **Objetivo 1: Selección y caracterización de los nitro-explosivos a estudiar.**

Los nitro-explosivos de los que se dispone, cedidos por la Universidad de Burgos, se caracterizarán para su manipulación e interpretación de datos durante del desarrollo del sensor.

- **Objetivo 2: Desarrollo y caracterización de nanopartículas fluorescentes multicolor estables basadas en complejos polifluoreno-vesícula lipídica.**

Se comenzará por caracterizar los polímeros que se van a utilizar: HTMA-PFP y HTMA-PFNT. Después, se procederá a la síntesis y caracterización de nanopartículas azules y rojas, seleccionando el componente lipídico y optimizando las concentraciones y condiciones de síntesis. Por último, se buscarán las condiciones óptimas para combinar distintos polímeros en un mismo sistema para la excitación simultánea.

- **Objetivo 3: Análisis de la capacidad sensora de las nanopartículas desarrolladas frente a distintos explosivos.**

Se pretende seleccionar las condiciones para optimizar la capacidad sensora de las nanopartículas frente a distintos explosivos, tanto por separado como en el sistema combinado, evaluando su sensibilidad, selectividad y rendimiento mediante los diagramas de Stern-Volmer.

- **Objetivo 4: Inmovilización de las nanopartículas fluorescentes en matrices sol-gel.**

Se llevará a cabo la inmovilización de las NPs en un sistema sol-gel para mejorar la manipulación del sensor y se evaluará la capacidad del dispositivo para detectar y discriminar explosivos y ser reutilizado.

- **Objetivo 5: Incorporación de un tercer polifluoreno con emisión en el verde.**

Pretendemos realizar un estudio preliminar sobre la posibilidad de incorporar un tercer polifluoreno de emisión en verde (HTMA-PFBT), para aumentar la selectividad del sensor.

3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3.1. MATERIALES.

3.1.1. Polímeros conjugados fluorescentes.

Los polímeros conjugados HTMA-PFP (M_n ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) = 4170; M_w ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) = 8340), HTMA-PFBT (M_n ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) = 4584; M_w ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) = 8531) y HTMA-PFNT (M_n ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) = 4507; M_w ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) = 8990) fueron sintetizados por miembros del laboratorio mediante la reacción de acoplamiento de Suzuki, utilizando Pd (II) como catalizador y trimetilamina en fase gaseosa para obtener el correspondiente polielectrolito catiónico.

3.1.2. Reactivos químicos.

Los fosfolípidos sintéticos L- α -Fosfatidil colina (PC), procedente de yema de huevo, y 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-rac-(1-glicerol) (sal de sodio) (DOPG), fueron adquiridos en Sigma-Aldrich, España.

Los compuestos nitroaromáticos TNT, DNT, DNBA y DNFB fueron cedidos por la Universidad de Burgos.

3.1.3. Disolventes y otros productos comerciales.

El Cloroformo y el DMSO (calidad espectroscópica) se adquirieron en Merck, Alemania, el tetraetoxisilicato (TEOS) en Sigma-Aldrich, España y los filtros de policarbonato de 0.1 micras en Nucleopore, Cambridge, MA, USA.

3.1.4. Disoluciones.

Las soluciones stock de los CPs fueron preparadas en dimetilsulfóxido (DMSO) y con una concentración final de $3.65\cdot 10^{-4}$ M para HTMA-PFP y HTMA-PFNT, y $6.24\cdot 10^{-4}$ para HTMA-PFBT (en unidades de repetición), y almacenadas a -20 °C antes de su uso.

Las soluciones stock de TNT, DNT, DNBA y DNFB fueron preparados en DMSO con una concentración final de $4.0\cdot 10^{-3}$ M.

El tampón fosfato (50 mM, NaCl 100 mM, pH 7.4) se preparó en agua Milli-Q dos veces destilada y desionizada utilizando el equipamiento Milli-Q (Millipore, Madrid).

3.2. MÉTODOS.

3.2.1. Preparación de nanopartículas fluorescentes (NPs).

En primer lugar, se disolvió el lípido (PC o DOPG) en cloroformo y se dejó secar con argón (Ar) en una campana de extracción, formándose una fina película lipídica en el fondo del vial. Se resuspendió la película de lípidos con tampón fosfato a temperatura ambiente utilizando un vórtex. De esta manera, se obtuvieron vesículas multilamelares (MLVs). Las LUVs (vesículas unilamelares grandes) se formaron por extrusión de las MLVs a través de filtros de policarbonato de 0.1 micras utilizando un extruder, cuya imagen se muestra en la figura 13.



Figura 13. Extruder utilizado para la preparación de LUVs con filtros de policarbonato de 100 nm de poro.

A la suspensión de LUVs preparada anteriormente, se le añadió el polímero (azul, verde o rojo) y se agitó en el vórtex. Antes de su adición, la alícuota de polímero en DMSO se descongeló a temperatura ambiente y se sonicó durante 1 minuto. En todos los casos la proporción de DMSO en la muestra acuosa fue siempre menor que 1% (v/v). La mezcla se dejó incubar, durante 1 hora en una estufa a 37°C para facilitar la incorporación del polímero a la membrana lipídica. Todo el proceso viene esquematizado en la figura 14.

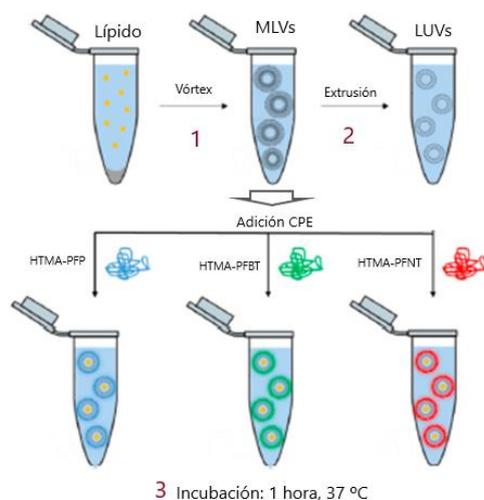


Figura 14. Protocolo esquemático de preparación de nanopartículas fluorescentes multicolor. 1) Preparación de MLVs en suspensión por autoensamblaje lipídico. 2) Preparación de LUVs por extrusión. 3) Incubación por separado con distintos polielectrolitos fluorescentes. Imagen modificada de: (Rubio-Camacho et al., 2019).

Una vez obtenidas las NPs, se introdujeron en cubetas de cuarzo para su posterior caracterización. La figura 15 muestra una fotografía de las NPs obtenidas, tras ser irradiadas con una lámpara UV. En la imagen se puede apreciar el diferente color de emisión dependiendo del polímero usado para su preparación.

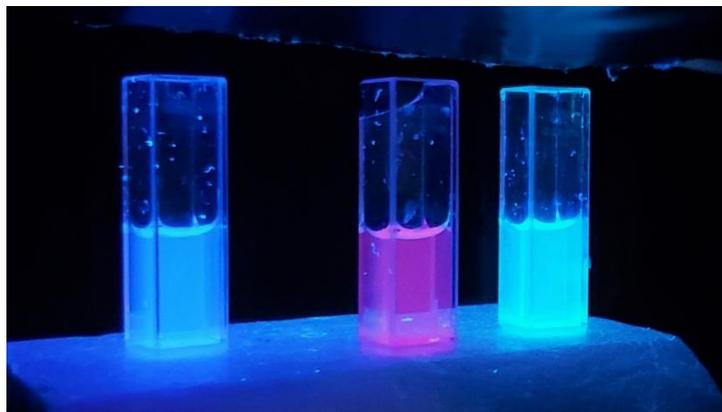


Figura 15. Imagen de las suspensiones de NPs, de izda. a dcha.: azules, rojas y verdes bajo irradiación con una lámpara UV.

3.2.2. Técnica de sol-gel para la formación de monolitos.

Preparación de TEOS hidrolizado: Se preparó una disolución stock de sílice (sol), mezclando TEOS (4.46 mL) con agua MQ (1.44 mL) y HCl 0.6 M (40 μ L), en un vial de boca ancha, a temperatura ambiente. La disolución, con dos fases claramente diferenciadas, se agitó vigorosamente durante aproximadamente 1 hora para producir la hidrólisis del TEOS, generando etanol. Para saber que la hidrólisis había finalizado, se tomó como referencia la aparición de una sola fase.

Rotación del TEOS hidrolizado: el objetivo de este paso fue lograr la completa eliminación del etanol generado durante la hidrólisis, ya que puede interferir negativamente con las biomoléculas inmovilizadas. Para ello, se mezcló una cantidad determinada de TEOS hidrolizado con agua MQ en una proporción 1:1. Se pesó el vial con la disolución en una balanza analítica y, a continuación, se sometió a rota-evaporación a vacío en rotavapor. Tras 7 minutos, aproximadamente, se detuvo la rotación y se pesó de nuevo el vial, con el objetivo de comprobar si todo el etanol había sido eliminado, sabiendo que 1 mL de TEOS contiene 0.62 g de etanol. El volumen perdido fue reemplazado con agua MQ.

Inmovilización de nanopartículas en la matriz: teniendo las NPs fluorescentes en cubetas desechables, se incorporó el TEOS rotado (ya que una vez adicionado la gelificación es muy rápida) en una proporción NP-matriz 1:1. A continuación, con la misma pipeta, se resuspendió la mezcla

cuidadosamente evitando la formación de burbujas. La formación del gel tuvo lugar en aproximadamente 15 minutos a presión y temperatura ambiente. Tras 60 minutos, se añadió tampón fosfato sobre la superficie de las matrices formadas para mantenerlas hidratadas, se taparon con parafilm y se guardaron a 4 °C durante, al menos, 48 horas.

Desmoldado de los monolitos: pasadas las 48 horas, se retiró el tampón que cubría los monolitos y se desmoldaron uno a uno, dando pequeños golpecitos sobre la bancada con la mano. El resultado eran monolitos de sílice 10x10 mm con las nanopartículas fluorescentes inmovilizados en su interior. Tras ser desmoldados, los monolitos se introdujeron en cubetas de cuarzo para caracterizar su fluorescencia, previamente a ser sumergidos en una disolución conteniendo una concentración fija de explosivo. La figura 16 muestra un ejemplo de los monolitos obtenidos.



Figura 16. Aspecto de las matrices preparadas por el proceso sol-gel.

3.2.3. Equipos de análisis y caracterización de nanopartículas fluorescentes.

Dispersión de Luz Dinámica (DLS)

El tamaño hidrodinámico y la polidispersión de las NPs en disolución se estudiaron mediante técnicas de DLS. El equipo empleado para el estudio fue el Malvern Zetasizer Nano-ZS, (Worcestershire, UK) equipado con un láser de Helio-Neón 4 mW ($\lambda = 633$ nm) con un ángulo de dispersión de 173°. Todas las mediciones se realizaron a 25°C y se obtuvo la media a partir de 3 repeticiones. Las cubetas utilizadas fueron de plástico desechable.

Espectrofotometría de absorbancia

Se recogen también los espectros de absorbancia de los analitos (explosivos) como parte de la caracterización de las propiedades ópticas de las moléculas. Las mediciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente utilizando cubetas de cuarzo, con el espectrómetro UV-2700 (Shimadzu, Tokio, Japón).

Espectrometría de fluorescencia

El equipo que se utiliza para las mediciones de los espectros y cinéticas de fluorescencia es el Espectrofluorímetro PTI-QuantaMaster (PTI, Birmingham, Nueva Jersey, EE.UU.) en interfaz con una célula peltier, y cubetas de cuarzo 10x10 mm. La longitud de onda de excitación se fija en función del polímero que contenga la muestra, a 380 nm para el azul, 425 nm para el verde y 510 nm para el rojo. Para la medición de sistemas de NPs combinados se excita a 335 nm y los espectros se recogen a 390 – 650 nm. La apertura de las rendijas se ajusta según el experimento, tratando de no superar muy por encima el millón en la intensidad de fluorescencia emitida.

En todos los casos se llevó a cabo la corrección de los espectros obtenidos por sustracción de la fluorescencia de fondo que emiten las LUVs, sin polímero, y por el efecto de la dilución generado por las adiciones de explosivo.

Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Las imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) se adquirieron mediante un microscopio Jeol 1011 (Jeol, Japón), trabajando a 80 kV, ubicado en los Servicios Técnicos de Investigación de la Universidad de Alicante. Las muestras fueron preparadas depositando una gota de éstas sobre una rejilla de cobre recubierta con una película de carbón y dejándolas secar al aire. A continuación, se añadió citrato de plomo como agente de contraste. Las imágenes se obtuvieron mediante una cámara Gatan Erlangshen ES500W.

3.2.4. Estudios de *quenching*.

La eficiencia del dispositivo para detectar el explosivo se basa en la desactivación de su fluorescencia o *quenching*. Para ello, generalmente se obtienen los ratios de intensidad de fluorescencia inicial/final en función la concentración de *quencher*. El análisis del apagamiento global viene definido mediante la ecuación de Stern-Volmer:

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_{sv} [Q] \quad (\text{Ec. 1})$$

donde I_0 e I son la intensidad de la fluorescencia en la ausencia y presencia de analito, respectivamente, $[Q]$ es la concentración de *quencher* o analito, y K_{sv} es la constante de Stern-Volmer. Por tanto, podemos decir que la K_{sv} expresa la eficiencia del huésped como desactivante de la fluorescencia. Además, esta constante se obtiene a partir de la pendiente de la recta que define la desactivación de la fluorescencia en su representación gráfica, por lo que será más eficiente cuanto mayor sea (Vallejos, 2014). En consecuencia, a mayor pendiente mayor sensibilidad frente al analito.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Siguiendo los objetivos del presente trabajo, a continuación se muestran los resultados obtenidos durante el desarrollo, optimización y aplicación del sensor fluorescente basado en polímeros conjugados, para la detección de explosivos nitroaromáticos en disolución. Los resultados serán discutidos al mismo tiempo que se presentan.

4.1. Selección y caracterización de nitro-explosivos.

En primer lugar, se caracterizaron los compuestos nitro-explosivos que se utilizan en el presente Trabajo de Fin de Máster, y que se espera que sean capaces de desactivar en mayor o menor medida la fluorescencia de las nanopartículas desarrolladas. Para ello, se exploró su solubilidad y algunas de sus propiedades fotofísicas.

Dentro de los nitro-explosivos de los que disponemos en el laboratorio, cedidos por la Universidad de Burgos, se seleccionaron el 2,4,6-trinitrotolueno (TNT), el 2,4-dinitrotolueno (DNT), el ácido 3,5-dinitrobenzoico (DNBA) y el 2,4-dinitro-1-fluorobenceno (DNFB), cuya estructura química se presenta en la figura 17, por la gran relevancia e interés que supone su detección, como se ha indicado en más detalle en el apartado de Introducción. Según la bibliografía, estos compuestos presentan una solubilidad muy baja o son prácticamente insolubles en agua. La tabla 1 recoge los valores de solubilidad expresada como la concentración de explosivo capaz de ser disuelto en medio acuoso.

En trabajos anteriores realizados por el grupo de investigación, se comprobó que pequeñas concentraciones %v/v de DMSO no afectaban a la integridad ni propiedades físicas de las nanopartículas fluorescentes, no provocando así interferencias en los experimentos realizados. Por ello, al igual que las alícuotas de polielectrolito conjugado utilizadas en este trabajo, se decidió preparar un stock de los explosivos en este mismo disolvente.

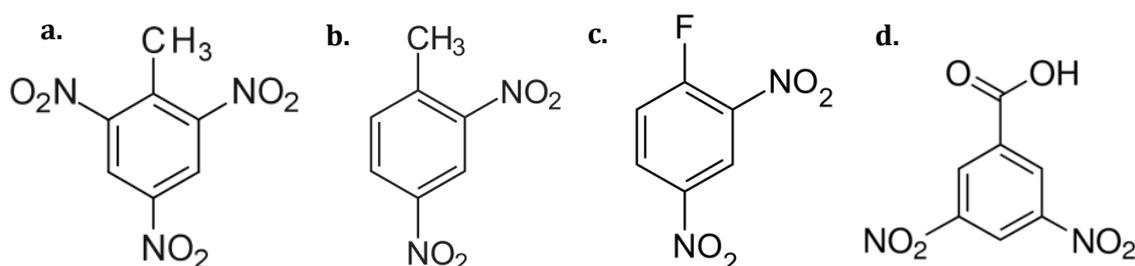


Figura 17. Estructura química de los nitro-explosivos: (a.) TNT, (b.) DNT, (c.) DNFB y (d.) DNBA.

Tabla 1. Solubilidad de nitro-explosivos en agua (M).*

| Nitro-explosivo | Solubilidad en agua (M) |
|-----------------|-------------------------|
| TNT | 0.0005 |
| DNT | 0.001 |
| DNBA | 0.01 |
| DNFB | 0.002 |

*Datos de solubilidad extraídos de la base de datos *Pubchem*.

Ya que la aplicación de nuestro sistema sensor se basa en la excitación y posterior emisión de las NPs fluorescentes, se recogieron los espectros de absorción UV-Vis de los explosivos para estudiar si en la región en la que absorben las NPs podrían también absorber los explosivos, lo que provocaría fenómenos de filtro interno que causarían una disminución de la señal de fluorescencia de los polímeros. Los espectros de absorbancia se obtuvieron a una concentración de 20 μM de explosivo en etanol y se muestran en la figura 18.

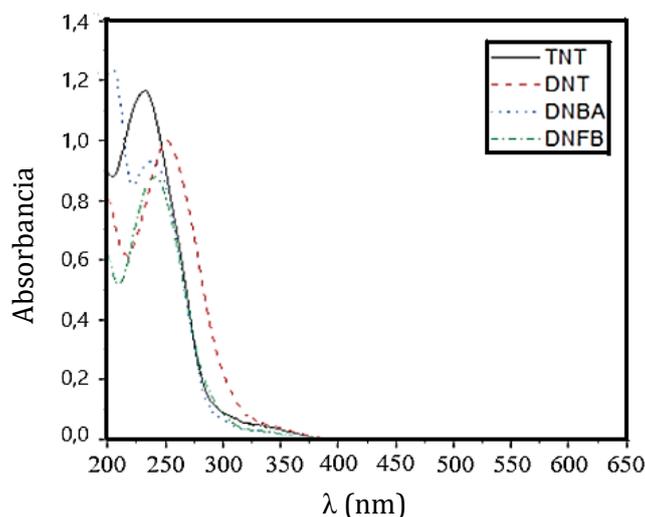


Figura 18. Espectros de absorción de los nitro-explosivos seleccionados en este trabajo.

Los resultados muestran que prácticamente no existe absorción por parte de ninguno de los explosivos a 380 nm, 425 nm o 510 nm, que es donde se excitan el polímero azul, verde y rojo, respectivamente. Tampoco hay absorción en la región donde presentan sus máximos de emisión (azul, 413 nm; verde, 490 nm y rojo, 625 nm), por lo que se concluye que no ocurrirán fenómenos de filtro interno, ni de transferencia de energía o reabsorción.

También se exploró si los explosivos mostraban alguna emisión de fluorescencia al ser excitados a 380 nm, 425 nm o 510 nm, que pudieran interferir en los estudios de *quenching*. En todos los casos la señal observada fue prácticamente despreciable, por lo que no se muestran los resultados.

4.2. Desarrollo y caracterización de NPs fluorescentes.

Como se ha mencionado en el apartado 1.3.2., la estructura química rica en electrones de los polímeros conjugados provoca que éstos tengan gran afinidad por los explosivos nitroaromáticos, deficientes en electrones. Es por ello que se espera que su interacción provoque una desactivación de la fluorescencia intrínseca del polímero, mediante un mecanismo de transferencia de energía fotoinducida (PET). Así, se propone el uso de dos polifluorenos catiónicos sintetizados en el laboratorio: el HTMA-PFP (emisión en azul) y el HTMA-PFNT (emisión en rojo) para la detección de explosivos, comenzando por el estudio del polímero azul, el de mayor rendimiento cuántico y el más caracterizado en estudios previos. Más tarde, se estudiará el comportamiento del polímero rojo, para finalmente estudiar el uso combinado de ambos polielectrolitos. Una desactivación de fluorescencia determinada en cada polímero permitirá establecer un patrón de *quenching* diferencial que facilite la detección e identificación del nitro-explosivo desconocido en disolución. Por último, se estudiará la posibilidad de incorporar un tercer polímero conjugado, el HTMA-PFBT (emisión en verde), para aumentar la especificidad del sensor.

En el apartado de Antecedentes también se comenta que el HTMA-PFP y, en general, los polielectrolitos conjugados, tienden a formar agregados en medio acuoso, disminuyendo drásticamente su estabilidad y señal fluorescente, lo que es una desventaja cuando se quieren utilizar como sensores. Una alternativa es estabilizarlos, haciéndolos interaccionar con otras especies. En el actual trabajo, tomando como referencia estudios previos llevados a cabo por el presente grupo de investigación, se propone la incorporación de estos polielectrolitos en vesículas lipídicas (LUVs) para obtener nanopartículas fluorescentes (NPs) estabilizadas en disolución.

Para facilitar el seguimiento del trabajo, comenzaremos estudiando las características del polímero HTMA-PFP en tampón y su interacción con LUVs formadas por fosfolípidos zwitteriónicos (PC de huevo) y aniónicos (DOPG), con objeto de seleccionar el mejor componente lipídico para la fabricación de las NPs azules. Posteriormente, se optimizará el protocolo de síntesis y se estudiará su rendimiento como detector de explosivos.

4.2.1 Caracterización de las NPs azules.

Las figuras 19a. y 19b. muestran, respectivamente, la estructura química del HTMA-PFP y los resultados del estudio de estabilidad de fluorescencia del polímero en tampón fosfato, donde se recogieron los espectros de fluorescencia en intervalos distintos hasta las 2 horas. El espectro de fluorescencia presenta dos bandas de emisión, la más intensa en torno a los 422 nm y otra menor a 450 nm. Vemos claramente cómo la intensidad de fluorescencia va decreciendo a lo largo de las 2 horas, confirmando la agregación del polímero, tal y como se ha descrito en los estudios previos del grupo de investigación.

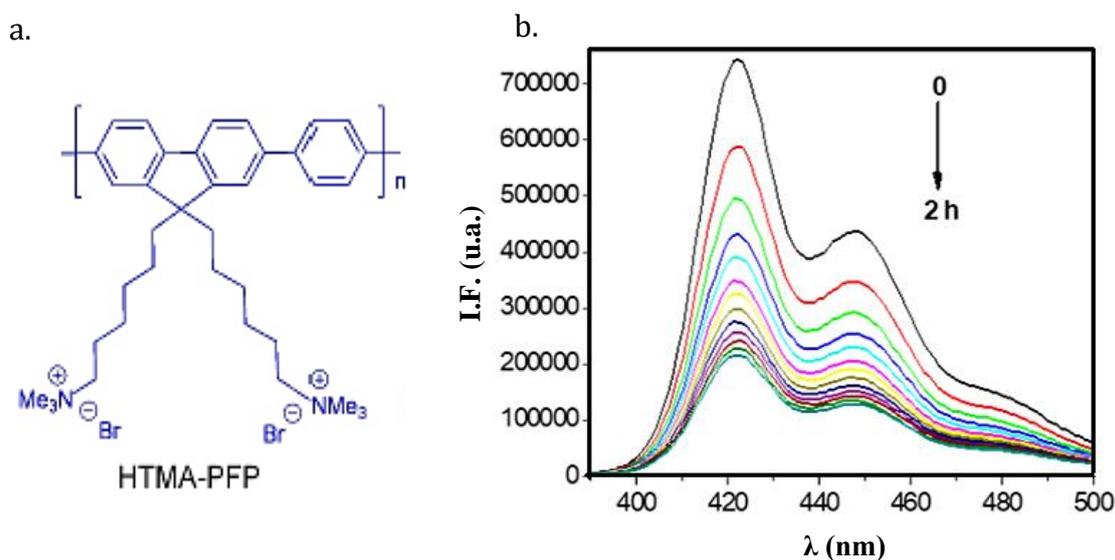


Figura 19. (A.) Estructura química del HTMA-PFP. (B.) Espectro de fluorescencia de HTMA-PFP en tampón pH 7.2, concentración 1.5 μM . Excitación a 380 nm y recogido a diferentes tiempos, hasta 2 horas.

Para estabilizar la señal de fluorescencia del HTMA-PFP a través de su incorporación en vesículas lipídicas, se prepararon diferentes muestras, conteniendo todas ellas la misma concentración de polielectrolito (1.5 μM) y concentraciones crecientes de LUVs de PC de huevo o de DOPG (0 a 1 mM en contenido lipídico) y se recogieron los espectros de fluorescencia tras una hora de incubación. Como se puede observar en la figura 20, los espectros se ven intensificados según va aumentando la concentración de vesícula en el medio, tanto en el caso de DOPG (fig. 20 a.), como en el caso de PC (fig. 20 b.). A su vez, tiene lugar un ligero desplazamiento del pico hacia el azul (ver espectros normalizados). Esta diferencia en la longitud de onda de emisión se relaciona con el grado de agregación del polímero, de manera que las cadenas poliméricas se vuelven más extendidas y la probabilidad de interacción polímero-polímero (agregación) se reduce, aumentando el rendimiento cuántico de fluorescencia.

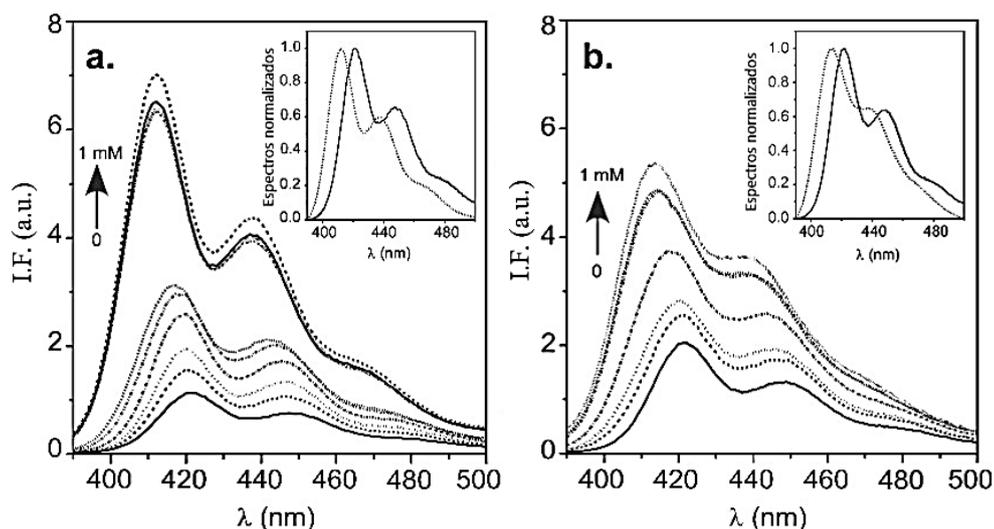


Figura 20. Espectros de emisión de soluciones de HTMA-PFP 1.5 μM en tampón a pH 7.2 en presencia de LUVs de DOPG (a.) y PC (b.) a concentraciones crecientes (0, 0.001, 0.002, 0.003, 0.004, 0.005, 0.05, 0.085, 0.5, 1 mM). Las imágenes insertadas muestran los espectros inicial y final normalizados.

Comparando ambas imágenes, el lípido aniónico DOPG parece aumentar la fluorescencia en mayor grado, y a concentraciones más bajas de lípido, lo que significa que la afinidad del HTMA-PFP es mayor por las LUVs de DOPG que por las de PC, probablemente debido a la atracción electrostática entre las cabezas aniónicas de los fosfolípidos y la carga positiva de los grupos tetrametilamonio del polielectrolito. En cualquier caso, cuando la concentración de lípido es 1 mM, se puede considerar que todo el polímero se ha incorporado en las vesículas, independientemente de que éstas sean aniónicas o zwitteriónicas. Una vez incorporado, se observó que la señal de fluorescencia ya no variaba, al menos tras 2 horas de preparación, confirmando que en ambos casos habíamos obtenidos NPs fluorescentes azules y estables.

Por otro lado, si comparamos los espectros de las NPs de DOPG y PC se puede observar que las dos bandas de fluorescencia características del polímero azul se ven mucho más resueltas en el caso de DOPG que en el de PC, además de estar ligeramente desplazadas hacia menores longitudes de onda (fig. 21). Este resultado indica que las cadenas poliméricas están menos agregadas tras insertarse en las LUVs de DOPG, que tras hacerlo en las de PC, un resultado que apoya el hecho de que la intensidad de fluorescencia sea mayor en las NPs aniónicas que en las zwitteriónicas.

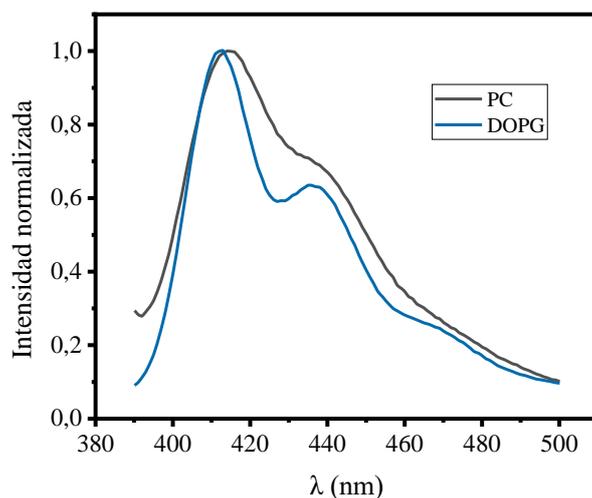


Figura 21. Espectros de emisión normalizados de NPs azules de PC y DOPG excitadas a 380 nm.

Con objeto de explorar en más detalle los dos tipos de NPs, se estudió el tiempo necesario para su formación. Para ello, se añadió el polielectrolito a una suspensión de LUVs y se registró el aumento en la señal de fluorescencia a 37°C. Cuando el experimento se realizó en presencia de LUVs de DOPG, la subida de fluorescencia fue inmediata y se mantuvo constante, debido probablemente a la fuerte interacción electrostática comentada anteriormente. Sin embargo, en el caso del PC, se necesitó al menos una hora para su total incorporación, como se muestra en la figura 22. Este resultado indica que las NPs de PC necesitan más tiempo de preparación que las de DOPG, cuya obtención es inmediata.

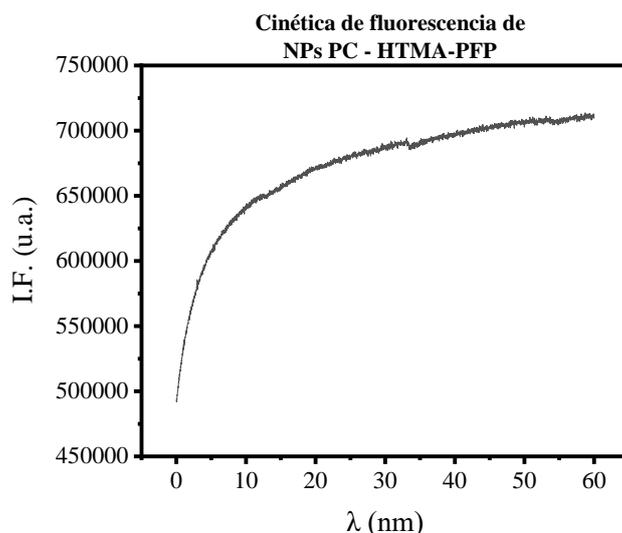


Figura 22. Cinética de fluorescencia de NPs de PC tras la adición de polímero azul a una suspensión de LUVs a 37°C. Excitación a 380 nm y emisión a 413 nm.

Una vez obtenidas las NPs fluorescentes con ambos tipos de vesículas lipídicas, se caracterizó su tamaño mediante DLS y se comparó con el tamaño de las LUVs obtenidas en ausencia de polímero. En la Tabla 2 se recoge el diámetro hidrodinámico para estas NPs y la polidispersión, medida que indica el grado de variación o amplitud de la distribución de tamaños dentro de una misma población de partículas. Inicialmente se midieron los tamaños correspondientes a NPs preparadas con ambos tipos de lípido, a las concentraciones comentadas anteriormente (1.5 μM de polímero y 1 mM de lípido). Además, se determinaron los tamaños para otras combinaciones de concentración, en particular en el caso de las NPs de DOPG, con objeto de comprobar si ello modificaba el tamaño final de la nanopartícula.

Los resultados indican que todas las medidas, tanto de NPs de PC como de DOPG, muestran una sola población de tamaño de partícula con una desviación mínima del diámetro medio. En cuanto a los tamaños de partícula obtenidos con PC, son siempre superiores a los obtenidos con DOPG. Por otro lado, la incorporación del polielectrolito, apenas modifica el tamaño final de la nanopartícula, independientemente de su concentración. Sólo se observó un ligero aumento en el caso de las NPs de PC. Finalmente, respecto a la polidispersidad, se observa una ligera diferencia entre la obtenida con NPs de PC y DOPG, siendo la de estas últimas menor. Esto indica que la población de NPs de DOPG no solo es de menor tamaño sino que éste se distribuye de forma más homogénea.

Tabla 2: Diámetro hidrodinámico y polidispersión de LUVs de PC y DOPG en ausencia y presencia de HTMA-PFP a distintas concentraciones.

| | Diámetro \pm sd (nm) | Polidispersión \pm sd |
|------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|-------------------------------------------|
| LUVs PC 1 mM | 151.4 \pm 1.2 | 0.101 \pm 0.019 |
| LUVs PC 1 mM + HTMA-PFP 1.5 μM | 155.0 \pm 0.9 | 0.106 \pm 0.008 |
| LUVs DOPG 1 mM | 124.0 \pm 1.0 | 0.072 \pm 0.026 |
| LUVs DOPG 1 mM + HTMA-PFP 1.5 μM | 124.3 \pm 0.8 | 0,075 \pm 0.006 |
| LUVs DOPG 0.5 mM + HTMA-PFP 0.75 μM | 124.5 \pm 0.8 | 0,082 \pm 0.006 |
| LUVs DOPG 0.5 mM + HTMA-PFP 0.5 μM | 123.0 \pm 0.3 | 0.052 \pm 0.002 |

Por último, la morfología de las NPs azules, formadas a partir de ambos fosfolípidos, fue caracterizada mediante TEM. Los resultados obtenidos, cuyas imágenes se muestran en la figura 23, indican que, independientemente del tipo de lípido utilizado, las NPs son prácticamente esféricas y sus tamaños son compatibles con los obtenidos por DLS.

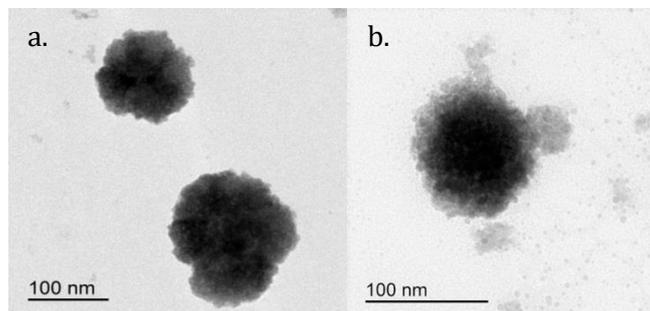


Figura 23. Imagen de TEM correspondiente a NPs constituídas por HTMA-PFP incorporado en vesículas lipídicas de PC (a.) y de DOPG (b.)

Como conclusión de los resultados obtenidos en este apartado, el lípido aniónico DOPG parece ofrecer mejores condiciones para la síntesis de las NPs, por su mayor afinidad con el HTMA-PFP y el menor tamaño de las NPs obtenidas, algo que será beneficioso para aumentar la superficie de detección. Sin embargo, todavía no es posible seleccionar las NPs más adecuadas para la detección de explosivos, ni tampoco la concentración de polímero más apropiada, hasta explorar el efecto que tienen éstos sobre la fluorescencia de ambos tipos de NPs.

4.2.2. Estudio de desactivación de la fluorescencia en NPs azules por TNT.

Una vez caracterizadas las NPs azules, tanto de PC como de DOPG, el siguiente paso fue evaluar su respuesta frente a concentraciones crecientes de explosivo, usando como referencia el TNT. La figura 24 muestra los resultados obtenidos en el estudio de la desactivación de la fluorescencia producida por el TNT en disoluciones de LUVs de DOPG y PC 0.5 mM y HTMA-PFP 0.75 μ M:

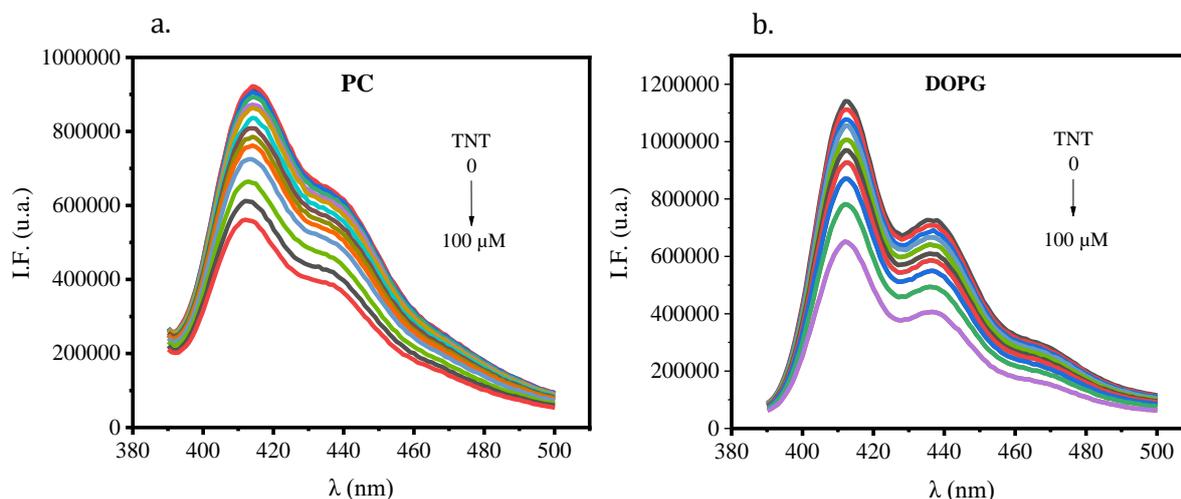


Figura 24. Espectros de emisión de NPs 0.5 mM de PC (a.) y DOPG (b.) – HTMA-PFP 0.75 μM en presencia de concentraciones crecientes de TNT (0 – 100 μM). Excitación a 380 nm.

Comparando los espectros de emisión de ambas NPs, se puede observar que la desactivación de fluorescencia causada por el TNT es bastante significativa, especialmente en las NPs de DOPG. La figura 25 muestra los diagramas de Stern-Volmer obtenidos a partir de los espectros de emisión en cada caso. Ambas gráficas son lineales y de su pendiente se puede extraer la constante de Stern-Volmer (K_{SV}), como se indica en el apartado 3.2.4 (ec. 1).

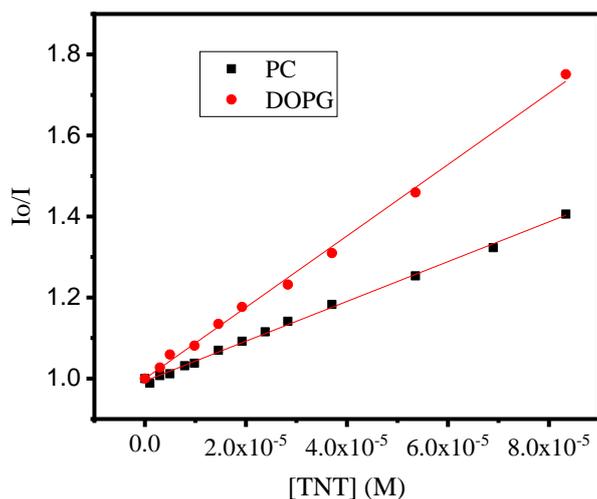


Figura 25. Diagramas de Stern-Volmer de NPs de PC y DOPG 0.5 mM en presencia de TNT (0 – 100 μM).

Como se comenta en el apartado de Antecedentes, esta constante se toma como referencia para medir el grado de desactivación de fluorescencia, de modo que a mayor valor, mayor sensibilidad. En este caso, se obtiene una constante de 8814 M^{-1} en la detección con DOPG y 4913 M^{-1} en la detección con PC, midiendo a estas condiciones. Por tanto, la K_{SV} obtenida con las NPs de DOPG es casi el

doble de la obtenida con PC, lo cual demuestra una mejor respuesta en la detección de TNT por parte de las NPs de DOPG.

A pesar de que todo apuntaba hacia la utilización de NPs aniónicas para el desarrollo del sensor, también se analizó si variando la relación polímero/lípido en las NPs de PC podíamos mejorar el valor de K_{SV} . Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 3. Como se puede observar en la tabla, los mayores valores de K_{SV} se obtienen a bajas concentraciones: 0.5 mM de lípido y 1.5 μM o 0.75 μM de polímero, aunque los valores siguen estando por debajo de los obtenidos para NPs aniónicas.

De igual manera, también se modificó la composición de las NPs de DOPG, variando la concentración de polímero, y se exploró el efecto del TNT sobre su fluorescencia, con objeto de ver si se podía aumentar el valor de K_{SV} reduciendo más la concentración de polímero. Los resultados, mostrados en la tabla 3, indican que la concentración de 0.75 μM de polímero es mejor que la de 0.5 μM .

Como resumen, además de lo mostrado en la Tabla 3, el gráfico de barras (fig. 26) recoge todas las constantes de Stern-Volmer obtenidas en los experimentos de desactivación por TNT, para las diferentes composiciones de NPs azules:

Tabla 3. Constantes de Stern-Volmer obtenidas frente a TNT con NPs de PC y DOPG a distintas concentraciones de lípido y polímero azul.

| Concentración de lípido | Concentración de polímero | K_{SV} (M^{-1}) |
|-------------------------|--------------------------------------|------------------------------|
| 1 mM PC | 3 μM | 2169.4 |
| 0.5 mM PC | 3 μM | 3511.5 |
| 0.5 mM PC | 1.5 μM | 5074.4 |
| 0.5 mM PC | 0.75 μM | 4912.7 |
| 0.5 mM DOPG | 0.75 μM | 8843.4 |
| 0.5 mM DOPG | 0.5 μM | 6444.6 |

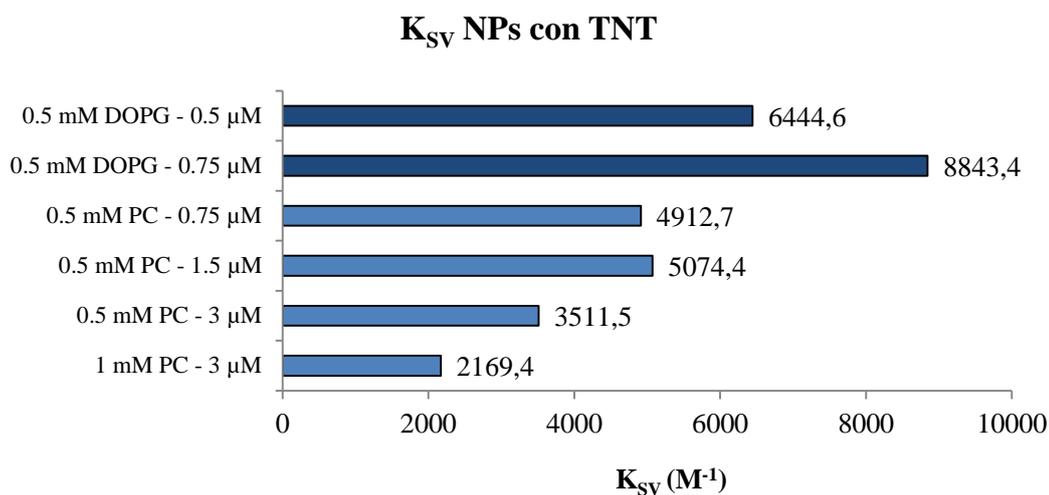


Figura 26. K_{SV} obtenidas con NPs de distintas composiciones frente a TNT. NPs de DOPG en azul oscuro y PC en azul más claro.

Como corroboran estos datos, por un lado, las K_{SV} obtenidas con DOPG (barras oscuras) son más elevadas que las obtenidas con PC de huevo. Por otro lado, vemos que a menor concentración de lípido y polímero tiende a aumentar la sensibilidad, pero sin sobrepasar el umbral de los 0.75 μ M de polímero. Por ello, la relación 0.5 mM de lípido y 0.75 μ M de polímero es la que se establece para la síntesis de NPs fluorescentes azules.

Finalmente, dada la mayor sensibilidad de las NPs de DOPG para la detección de TNT, su menor tamaño de partícula y su mayor estabilidad e intensidad de fluorescencia, se selecciona este lípido como el componente lipídico para la fabricación de las NPs.

4.3. Desarrollo y caracterización de NPs rojas.

Siguiendo la misma estrategia que con el polímero azul, la fluorescencia del polímero rojo, HTMA-PFNT, cuya estructura se muestra en la figura 27a., se estabilizó mediante su incorporación en vesículas lipídicas. Para ello se prepararon diferentes muestras, conteniendo todas ellas la misma concentración de HTMA-PFNT (1.5 μ M) y concentraciones crecientes de LUVs de PC y de DOPG. Los espectros de fluorescencia de las distintas muestras se representan en la figura 27b. (DOPG) y 27c. (PC). Los resultados muestran que la emisión del polímero en tampón presenta una única banda ancha cuyo máximo, cercano a 630 nm, aumenta de intensidad y se desplaza hacia el azul conforme se incrementa la cantidad de lípido, hasta estabilizarse a concentraciones cercanas a 0.5 – 1 mM. De nuevo se observó una mayor afinidad del polielectrolito por las vesículas negativas, por lo que

teniendo en cuenta este resultado y los obtenidos con el polímero azul, decidimos seleccionar este lípido para formar las NPs rojas.

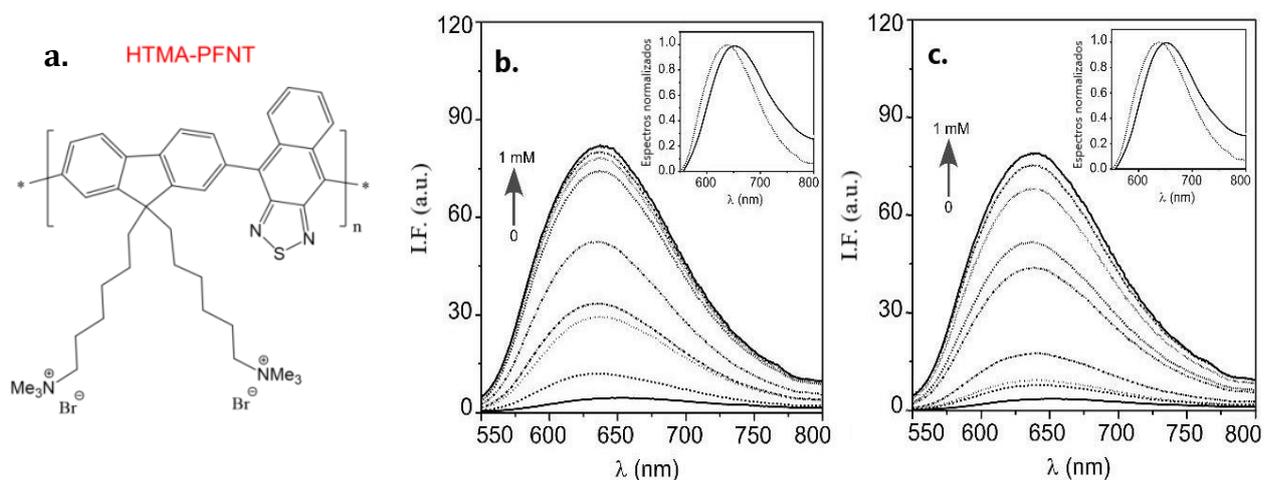


Figura 27. (A.) Estructura química del polielectrolito rojo. (B.) y (c.) Espectros de fluorescencia del polímero rojo, HTMA-PFNT, en presencia de concentraciones crecientes (0, 0.001, 0.002, 0.003, 0.004, 0.005, 0.05, 0.085, 0.5, 1 mM) de LUVs de DOPG (b.) y PC (c.).

4.3.1. Caracterización de NPs rojas.

Una vez seleccionada la composición de las NPs rojas, se caracterizó mediante DLS su tamaño hidrodinámico y polidispersión, así como sus propiedades de fluorescencia. Tal y como muestra la tabla 4, el tamaño hidrodinámico de las NPs antes y después del acoplamiento del polímero rojo se considera igual, teniendo en cuenta las desviaciones. La polidispersión que presentan estas NPs también es muy baja, lo cual indica una distribución homogénea del tamaño de partícula dentro de la población, que es única.

Tabla 4. Tamaño hidrodinámico y polidispersión de NPs rojas caracterizadas por DLS.

| Concentración NPs | Tamaño hidrodinámico (nm) | Polidispersión (nm) |
|---------------------------------|---------------------------|---------------------|
| NPs DOPG 1 mM | 124.5 ± 0.9 | 0.072 ± 0.027 |
| NP DOPG 1 mM – HTMA-PFNT 1.5 μM | 125.8 ± 1.7 | 0.083 ± 0.007 |

En la figura 28a. se observa el espectro de fluorescencia de las NPs rojas, recogido tras excitar la muestra a 510 nm. Este espectro es similar al mostrado en la figura 27, cuando todo el

polielectrolito está incorporado en las vesículas lipídicas. Sin embargo, para obtener una señal de fluorescencia comparable a la obtenida con las NPs azules, fue necesaria la mayor apertura de las rendijas de entrada y salida de luz del fluorímetro. Esto se debe a que el rendimiento cuántico del polímero rojo es bastante menor que el del polímero azul. Por otro lado, la figura 28b. muestra los espectros de excitación de las NPs azules y rojas. Como podemos ver, el pico de excitación de las NPs azules se encuentra a 380 nm, mientras que las NPs rojas presentan dos bandas de excitación, una sobre los 335-340 nm y otra más amplia hacia 500-510 nm. Esta información será importante cuando se exciten simultáneamente los dos tipos de NPs, como se verá más adelante.

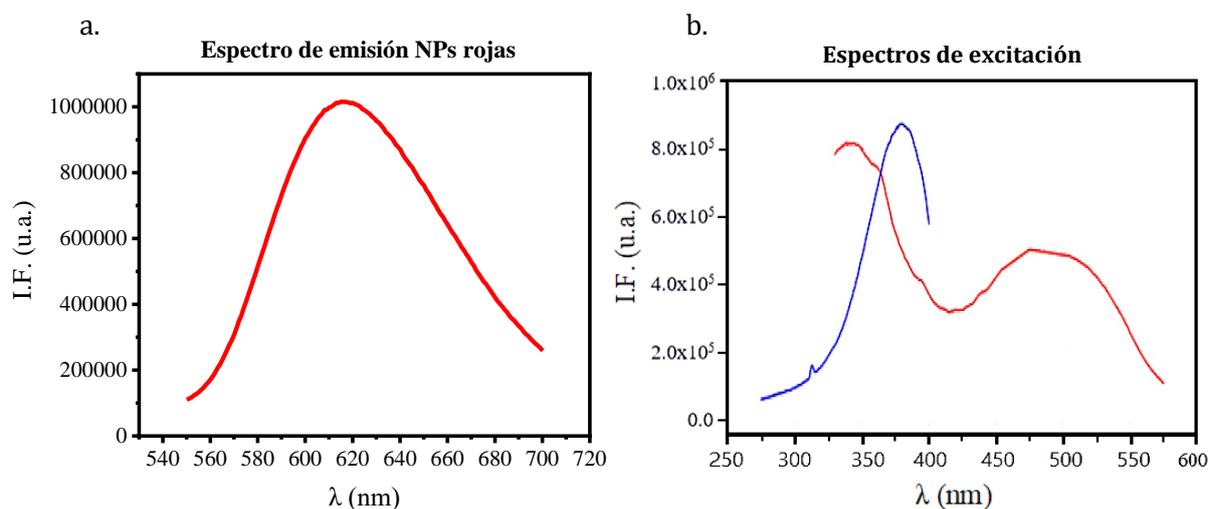


Figura 28. Espectro de emisión de fluorescencia de las NPs rojas tras ser excitadas a 510 nm. b. Espectros de excitación de ambas NPs tras ser recogidos a sus respectivos máximos de emisión.

4.3.2. Capacidad de detección de TNT de NPs fluorescentes rojas.

Dado que las NPs rojas son menos fluorescentes que las azules, los experimentos de desactivación de fluorescencia con TNT se hicieron al doble de concentración que los realizados con las NPs azules, para tener una mejor señal fluorescente de partida. Así, en vez de trabajar a concentraciones de 0.5 mM de lípido y 0.75 μM de polímero, los ensayos se realizaron a 1 mM y 1.5 μM , respectivamente. La figura 29a. muestra los espectros de emisión de las NPs rojas recogidos tras realizar adiciones crecientes de TNT, hasta 100 μM . Al igual que ocurrió con las NPs azules, la intensidad decreció conforme aumentaba la concentración de TNT. La gráfica de Stern-Volmer obtenida a partir de estos resultados se muestra en la figura 29b. El valor de $K_{SV} = 4585,5 \text{ M}^{-1}$ fue prácticamente la mitad que el obtenido con las NPs azules, lo que sugiere que la capacidad desactivante del TNT es mayor sobre las NPs azules que sobre las rojas.

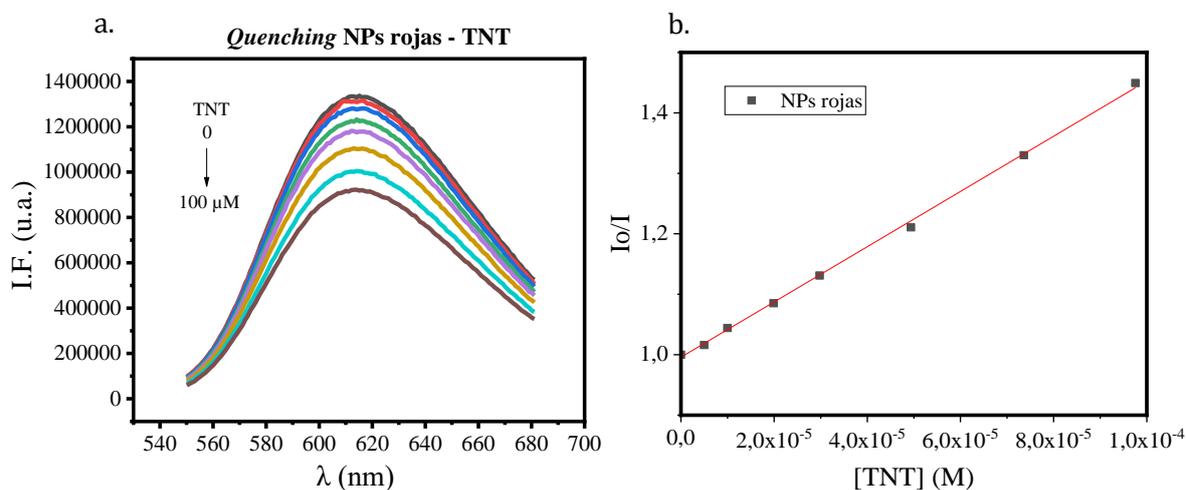


Figura 29. (A.) Espectros de emisión fluorescente de NPs rojas (1 mM – 1.5 μM) a concentraciones crecientes de TNT (0 – 100 μM). (B.) Representación de Stern-Volmer a concentraciones crecientes de TNT.

4.4. Acoplamiento de NPs azules y rojas en el mismo sistema.

Una vez estudiada la desactivación de la fluorescencia de las NPs azules y rojas por el TNT, por separado, el siguiente paso fue combinar ambas NPs en una misma muestra y observar cómo afectaba al espectro, tras añadir concentraciones crecientes de TNT y excitar a una longitud de onda en la que absorbieran ambas NPs. Por otro lado, como el rendimiento cuántico de las NPs azules es muy superior al de las NPs rojas, se buscó una longitud de onda a la que el polímero rojo absorbiera mucho más que el azul. En la figura 30, se representan los espectros de absorción de ambos polímeros, que como era de esperar, presentan bandas similares a las de los espectros de excitación mostrados en la figura 28b. Hacia los 335 nm el polímero rojo presenta un máximo, mientras que el azul solo absorbe ligeramente. Por ello, se seleccionó dicha longitud de onda para llevar a cabo el experimento.

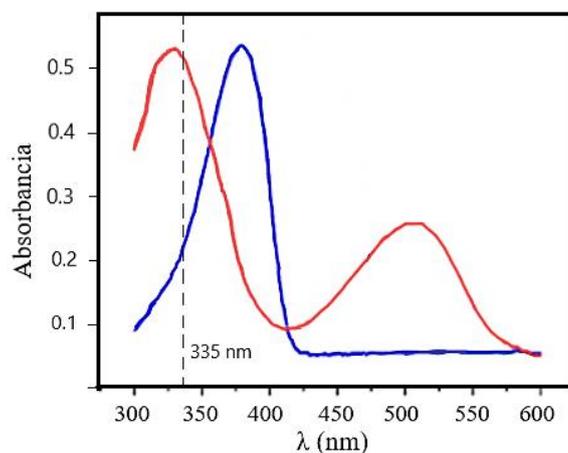


Figura 30. Espectros de absorción de polímeros azul (HTMA-PFP) y rojo (HTMA-PFNT).

Como paso previo, se confirmó que los explosivos no emitían apenas fluorescencia al ser excitados a dicha longitud de onda, por lo que no interferirá en los estudios de *quenching*. Además, se verificó que las NPs azules eran capaces de emitir al excitarse a 335 nm y respondían frente a la presencia de TNT de una manera similar a como lo hacían al ser excitadas a 380 nm. La figura 31 muestra los espectros de fluorescencia recogidos en las mismas condiciones a ambas longitudes de onda. Los espectros parecen resueltos y regulares en ambos casos. En líneas generales, podemos destacar la diferencia de intensidad de fluorescencia que se obtiene, algo lógico teniendo en cuenta el bajo coeficiente de extinción para el polímero azul a 335 nm. La figura 31 muestra también el efecto de la adición de TNT sobre los espectros. La eficiencia de *quenching* fue bastante similar, por lo que no parece existir ningún inconveniente en excitar las NPs azules a esta longitud de onda.

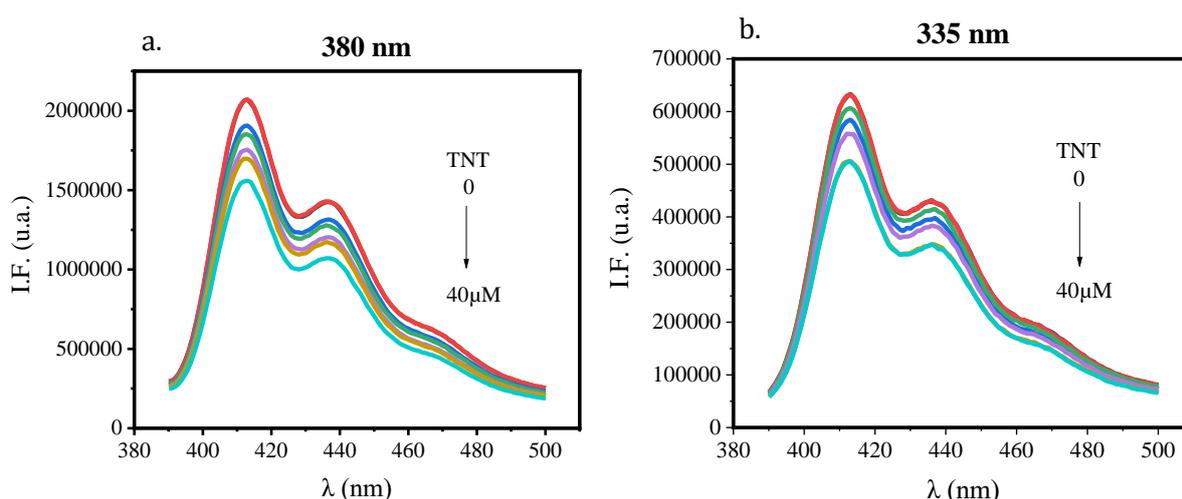


Figura 31. Espectros de emisión fluorescente de NPs de DOPG tras su excitación a diferentes longitudes de onda (a.: 380 nm, b.: 335 nm) y adición de concentraciones crecientes de TNT, desde 0 a 40 μM .

4.4.1. Optimización del sistema de NPs combinado.

Para lograr un sistema de NPs combinado, fue necesario establecer unas condiciones en las que se obtuvieran bandas similares de fluorescencia azul y roja. Para ello, se jugó con la concentración de ambas NPs. Se preparó una suspensión de NPs rojas 1 mM – 1.5 μM en lípido y polímero y una suspensión de NPs azules 0.5 mM – 0.75 μM en lípido y polímero.

Inicialmente, se pusieron volúmenes similares de ambas suspensiones, pero la fluorescencia azul quedaba muy por encima en intensidad que la roja, de modo que rechazamos esta relación. A continuación, se probó con una relación 1:3 (azul - rojo) en volumen, con la que se obtuvieron resultados muy favorables (fig. 32) ya que igualamos bastante la intensidad de fluorescencia de ambas bandas.

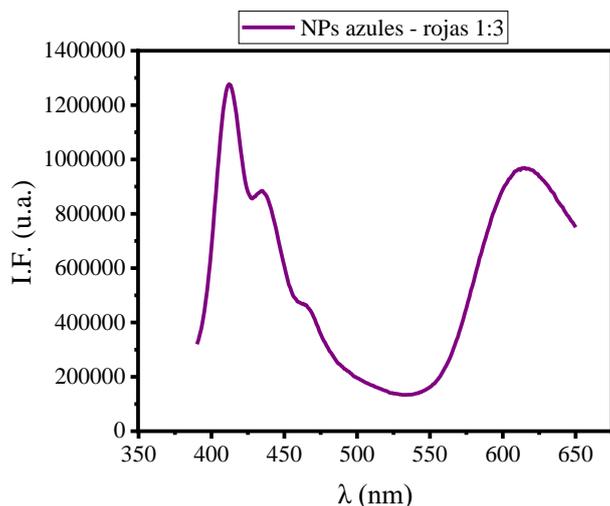


Figura 32. Espectro de emisión de NPs azules – rojas en una relación 1:3 en volumen, tras ser excitadas a 335 nm. El espectro no se pudo recoger a mayores longitudes de onda debido a la luz del segundo armónico (670 nm).

4.4.2. Capacidad de detección de TNT del sistema de NPs combinado.

Una vez seleccionadas las condiciones para la obtención del sistema combinado, se procedió a evaluar su capacidad de detección de TNT. Tanto la intensidad de la banda azul como la de la roja se vieron afectadas por la presencia de TNT, especialmente la banda azul, tal y como muestra la figura 33a. A partir de estos espectros se representaron los gráficos de Stern-Volmer para cada banda (fig. 33b.), obteniéndose valores de $K_{SV} = 35582 \text{ M}^{-1}$ (banda azul) y $K_{SV} = 14501 \text{ M}^{-1}$ (banda roja), que fueron considerablemente superiores a los encontrados para las NPs por separado. La razón de este aumento es todavía una incógnita y estamos tratando de interpretarlo. Además, a altas concentraciones de TNT parece perderse la linealidad, lo que sugiere que más de un mecanismo está siendo responsable de la desactivación de las NPs. Es posible que, debido a que el TNT absorbe ligeramente a 335 nm (ver espectro de absorción en fig. 18), tenga lugar un efecto de filtro interno en presencia de altas concentraciones de explosivo, originando la desviación de la linealidad y el aparente aumento de K_{SV} .

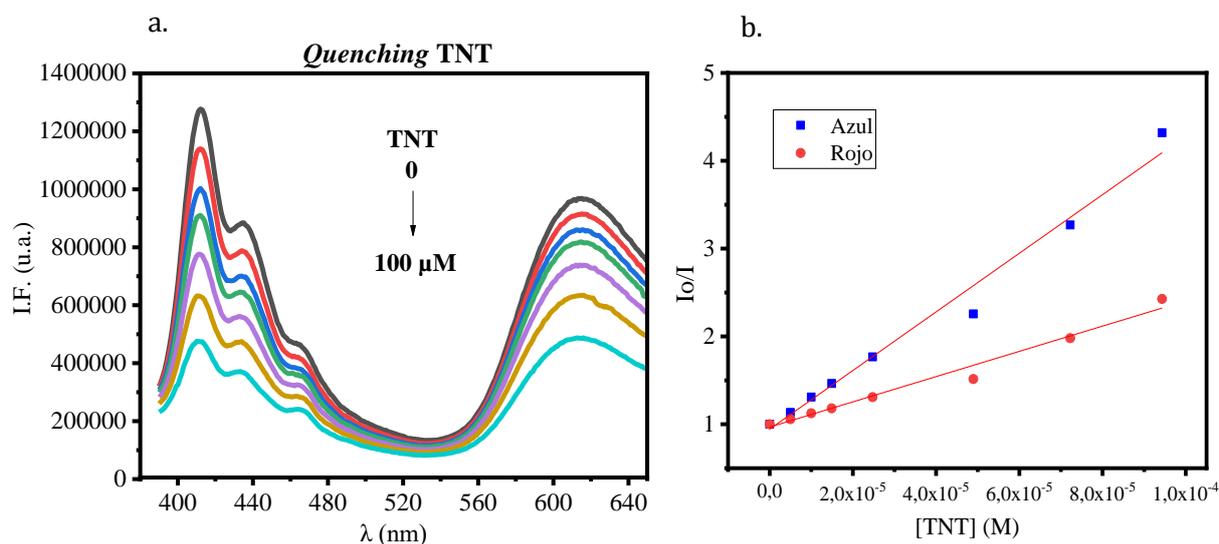


Figura 33. (A.) Espectros de fluorescencia de sistema combinada de NPs azules-rojas 1:3 en disolución frente a concentraciones crecientes de TNT (0 – 100 μM). (B.) Rectas de Stern-Volmer de NPs azules y rojas 1:3 frente a TNT.

4.4.3. Aplicación del sensor en disolución para detección y discriminación de compuestos nitroaromáticos.

Una vez explorado el efecto del TNT frente al sistema combinado azul/rojo, se prosiguió con la evaluación del efecto que provocaban sobre este sistema el resto de explosivos. La figura 34 a-d compara los espectros de emisión de este sistema en presencia de concentraciones crecientes de los 4 explosivos (TNT, DNT, DNBA y DNFB) en disolución, con el fin de hallar un patrón que permita su discriminación.

De los espectros mencionados, tras el tratamiento de datos, se obtuvieron las K_{SV} frente a los distintos explosivos, que se muestran de forma comparativa en la figura 35. Como podemos observar, el explosivo que mayor desactivación genera en ambas bandas es el TNT, seguido del DNT y DNFB, ambos con un efecto muy similar, siempre mayor en la banda correspondiente al azul, y por último el DNFB, cuya eficiencia de *quenching* es muy reducida en las dos bandas. En la figura 36 se representa en 3D el conjunto de las gráficas de Stern-Volmer recogidas para cada explosivo, donde podemos apreciar claramente el *quenching* diferencial causado en ambas bandas por cada uno de ellos.

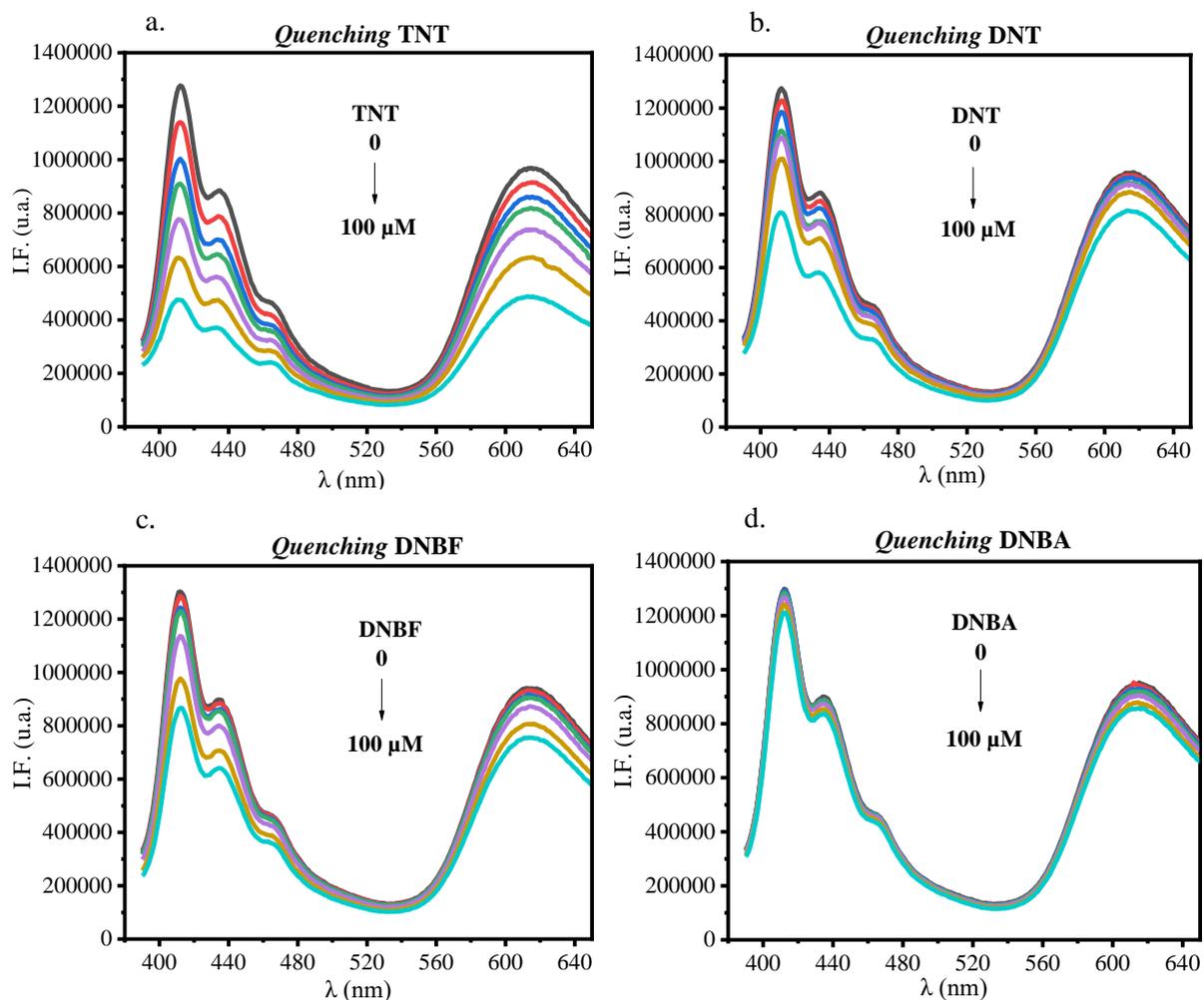


Figura 34. Espectros de fluorescencia de NPs azules-rojas 1:3 en presencia de TNT (a.), DNT (b.), DNFB (c.) y DNBA (d.).

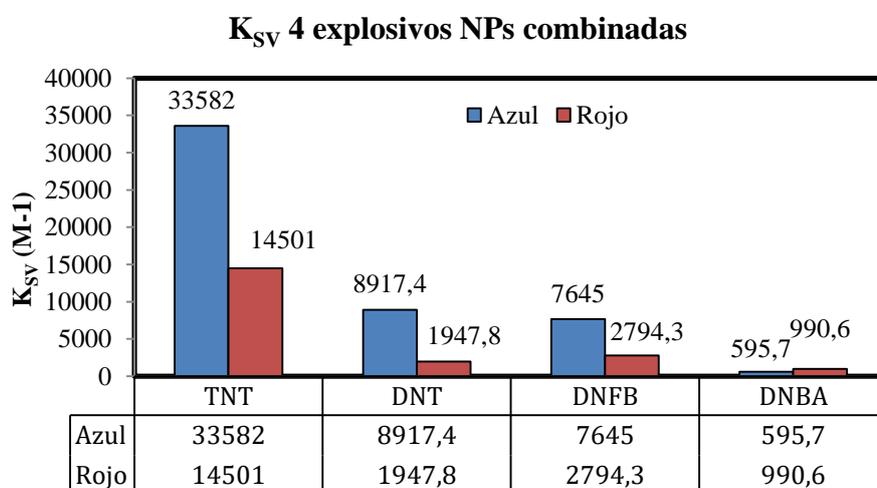


Figura 35. Constantes de Stern-Volmer (M^{-1}) obtenidas frente a distintos explosivos con el sistema sensor de NPs combinadas azules – rojas 1:3 en disolución.

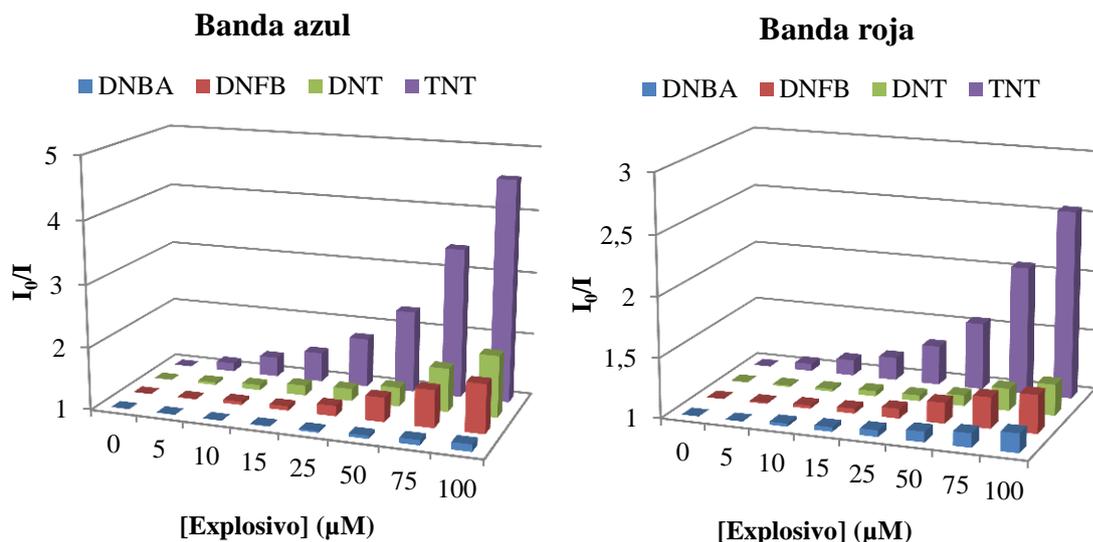


Figura 36. Representación 3D de gráficas de Stern-Volmer para cada banda del espectro (azul y roja) frente a los distintos explosivos.

Además, con el sistema de detección combinado en disolución, podemos obtener una relación de desactivación distinta entre los polímeros azul y rojo (fig. 37), que junto con los valores de K_{SV} , ayudarían a su discriminación. Por ejemplo, el DNT y el DNFB muestran valores de K_{SV} muy parecidos en ambos polímeros, pero si se divide la K_{SV} correspondiente a la banda azul, entre la correspondiente a la banda roja, obtenemos un cociente que sí indica que los resultados son distintos.

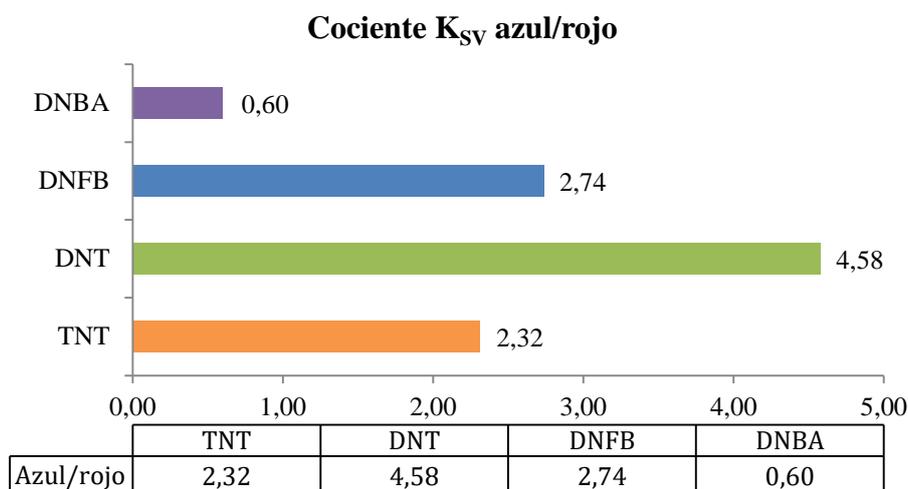


Figura 37. Cociente entre valores K_{SV} de bandas azul/roja obtenido con el sistema combinado de NPs en disolución frente a distintos explosivos.

4.5. Inmovilización de NPs en matriz sol-gel.

Uno de los objetivos que persigue este trabajo es el desarrollo de un sensor que sea reutilizable y fácilmente manipulable, capaz de detectar compuestos nitroaromáticos en medio acuoso. Los experimentos anteriores indican que las NPs desarrolladas detectan la presencia de estas sustancias, sin embargo, es necesaria su inmovilización para que el dispositivo final se pueda reutilizar y sea sencillo de manejar. Para ello, las NPs seleccionadas fueron encapsuladas en matrices empleando la metodología sol-gel. Como se ha mencionado anteriormente, este método de atrapamiento permite la retención de macromoléculas en el interior de las cavidades de una matriz sólida, porosa y transparente, propiedad que permite el uso de técnicas ópticas, como la fluorescencia. De esta manera, las NPs quedarían inmovilizadas sin que su integridad y propiedades fluorescentes se vieran alteradas, permitiendo la difusión del analito a través de la matriz porosa, así como la regeneración del sensor una vez lavado. La posibilidad de reutilizar este dispositivo supondría un gran ahorro económico y de material en la detección de explosivos de interés.

4.5.1. Caracterización de NPs azules, rojas y combinadas en monolitos sol-gel.

Las NPs azules y rojas se inmovilizaron siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.2.2. de Procedimiento Experimental. De esta manera, se obtuvieron monolitos transparentes de 10x10 mm. En la figura 38a. se muestran los espectros de emisión de fluorescencia normalizados de las NPs fluorescentes azules, preparadas en disolución e inmovilizadas, siendo excitadas a 380 nm. La figura 38b. muestra los espectros de emisión normalizados correspondientes a las NPs rojas, al ser excitadas a 510 nm, tanto en disolución como inmovilizadas.

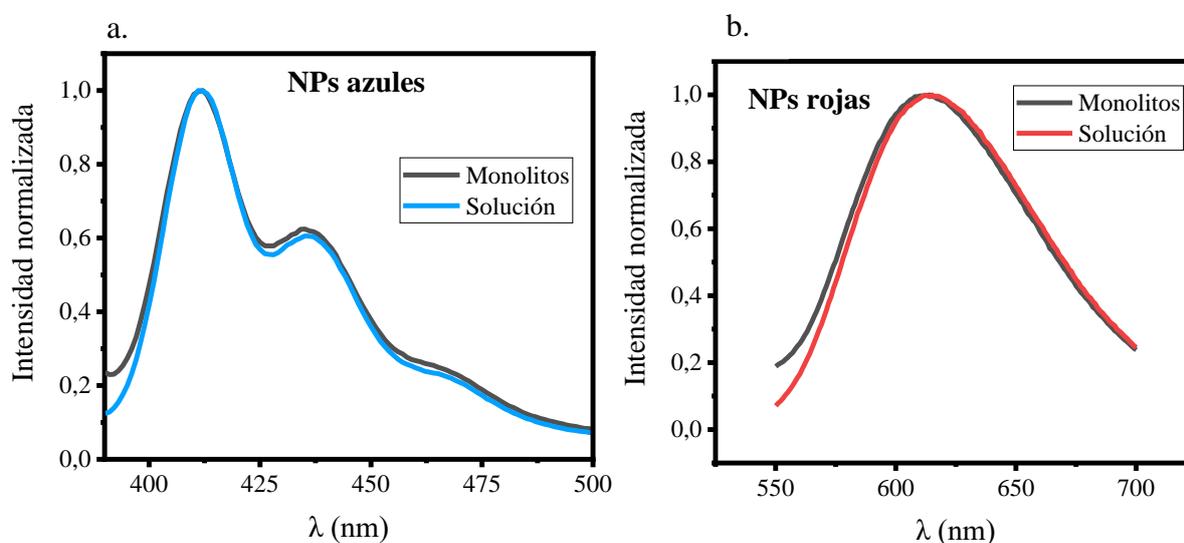


Figura 38. Espectros de emisión normalizados de NPs azules (a.) rojas (b.) en disolución e inmovilizadas en matriz TEOS.

Tanto para las NPs azules como para las rojas, se observa una gran similitud entre sus espectros en disolución e inmovilizados, confirmando que ambas NPs han quedado retenidas en el interior de la matriz tras su inmovilización y que mantienen sus propiedades ópticas.

Una vez confirmado esto, se procedió a incorporar NPs azules (25%) y rojas (75%) en el mismo sistema (monolito). En la figura 39 se muestra el espectro de emisión de fluorescencia de este monolito, excitado a 335 nm y se compara con el obtenido para la misma combinación de NPs en disolución. De nuevo se comprobó que la inmovilización de ambas NPs en el mismo sistema fue exitosa, permitiendo la obtención de dos bandas de emisión en el azul y rojo perfectamente distinguibles cuando las NPs son excitadas a la misma longitud de onda.

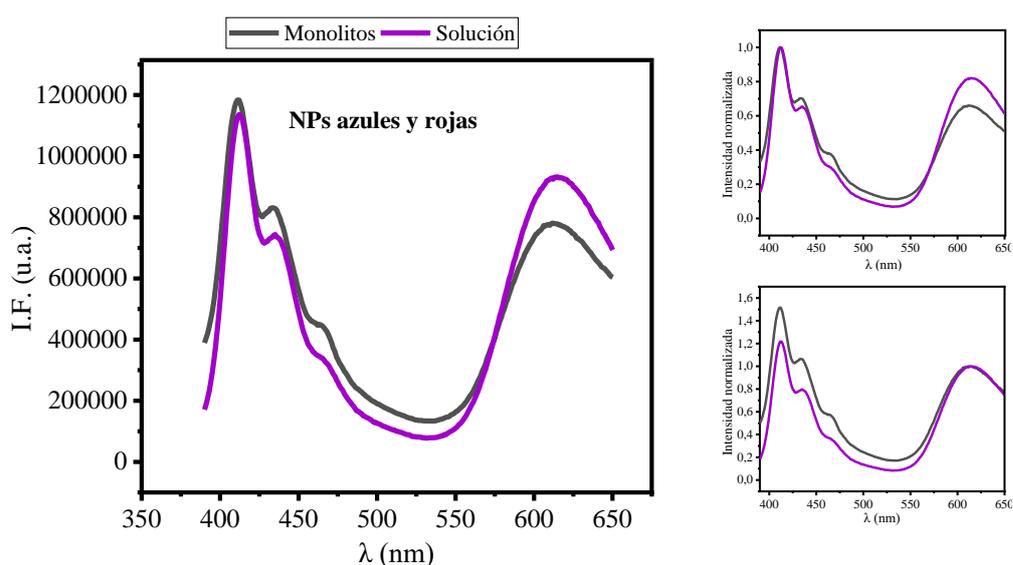


Figura 39. Espectros de emisión fluorescente de NPs azules y rojas 1:3 inmovilizadas y en disolución. Espectros normalizados (derecha) para cada banda: polímero azul abajo y rojo arriba.

4.5.2. Aplicación del sensor inmovilizado: detección de explosivos.

Una vez inmovilizadas las nanopartículas, el siguiente paso fue determinar si el analito (TNT) era capaz de difundir a través de la matriz porosa e interactuar con las NPs, produciendo así la desactivación de su fluorescencia, como se había observado previamente en los estudios en disolución.

Para ello, se introdujo el monolito con NPs azules y/o rojas en una disolución con una concentración de TNT 100 μM y se recogieron los espectros de fluorescencia durante aproximadamente 3 horas, en intervalos de 10 minutos. Cada muestra fue excitada en la longitud de onda correspondiente al tipo de NP inmovilizada, 380 nm para las azules, 510 nm para las rojas y 335 nm para el sistema combinado. A partir de estos espectros se obtuvo la cinética de desactivación causada por el TNT en las NPs inmovilizadas.

Las figuras 40a., 40c. y 40e. muestran los espectros de emisión de fluorescencia de las NPs inmovilizadas azules, rojas y ambas combinadas, respectivamente, en presencia del explosivo TNT, junto a la cinética de desactivación para cada caso (fig. 40b., 40d. y 40f.), representada en forma de intensidad de fluorescencia máxima registrada en función del tiempo (minutos).

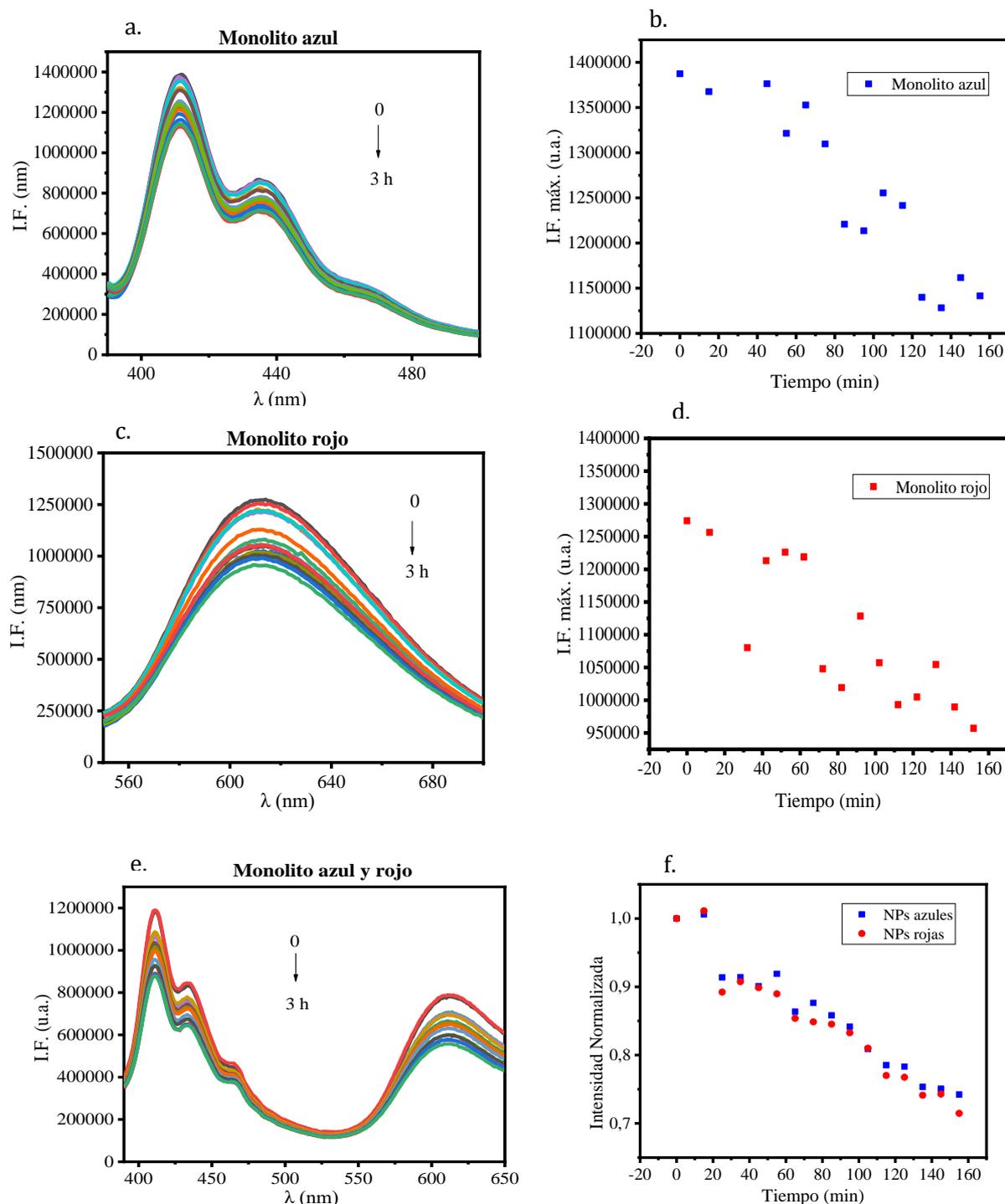


Figura 40. Espectros de emisión recogidos en intervalos de 10 minutos hasta las casi 3 horas en los monolitos de NPs azules (a.), rojas (c.) y combinadas (e.) en presencia de TNT 100 μ M. Las gráficas (b.), (d.), y (f.) determinan las respectivas cinéticas de desactivación de fluorescencia mostrando la I.F. máx. (b. y d.) e intensidad normalizada (f.) en función del tiempo (min).

Tras unos 160 minutos de inmersión en TNT, el monolito de NPs azules presenta un 82.28% de fluorescencia; el monolito con NPs rojas presenta un 75.12%; y el monolito con NPs azules y rojas un 74.23% para la banda correspondiente al azul y un 71.48% para la correspondiente al rojo.

Por ello, los resultados indican que el TNT es capaz de desactivar la fluorescencia de las NPs azules y rojas (solos o combinadas), aunque lo hace de una manera más lenta que en disolución. Esto probablemente se deba a que el TNT tiene que difundir a través de la matriz porosa hasta llegar a interactuar con las NPs. Además, no parece que la fluorescencia llegue a estabilizarse pasadas las casi 3 horas, por lo que suponemos que la desactivación total producida por el TNT en las NPs inmovilizadas es mayor de lo que se recoge.

Tras estos resultados, por tanto, sería necesario optimizar las condiciones de inmovilización de las NPs para conseguir aumentar la velocidad de difusión del analito por la matriz porosa. Además, quedaría pendiente un estudio de su posible reutilización, tras el lavado de los monolitos.

4.6. Incorporación del polímero verde.

En una primera aproximación, se pretendió incorporar en disolución un tercer polímero con emisión en el verde, el HTMA-PFBT, con el objetivo de dotar al sensor de una mayor especificidad. Como ya se indicó en el apartado 1.4.2., si comparamos los espectros de absorción de los tres polímeros, se observa que existen longitudes de onda comunes a las que podrían ser excitados simultáneamente (fig. 41a). Una de estas longitudes es 335 nm, la misma que se utilizó para excitar las NPs azules y rojas.

Para confirmar que esta longitud de onda seguía siendo adecuada, se prepararon NPs azules y verdes con 0.5 mM de lípido y 0.75 μ M de polímero y NPs rojas con 1 mM de lípido y 1.5 μ M de polímero. En el caso de las NPs verdes, también se utilizó el DOPG como componente lipídico. Se probaron distintas combinaciones de NPs y tras excitar a 335 nm, se recogieron sus espectros de emisión. Las concentraciones que dieron los mejores resultados fueron: 0.05 mM de NPs azules, 0.2 mM de verdes y 0.5 mM de rojas (fig. 41b).

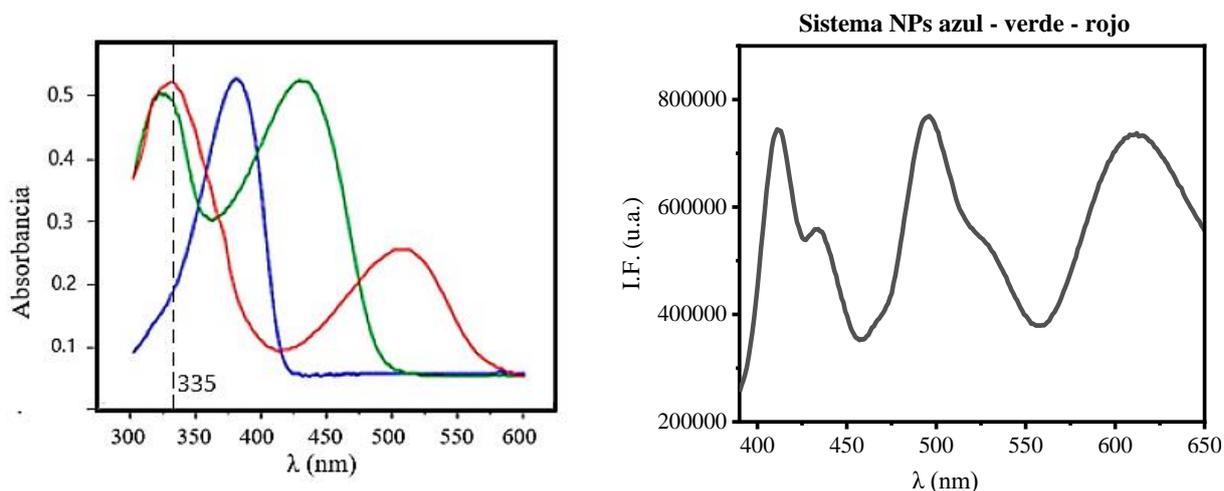


Figura 41. (A.) Espectros de absorción de polímeros azul, rojo y verde. (B.) Espectro de emisión de NPs DOPG azules, rojas y verdes combinadas excitadas a 335 nm.

Como podemos ver en la figura 41b., el espectro de emisión de este sistema multicolor muestra tres bandas perfectamente diferenciadas y resueltas, con intensidad muy similar y lo suficientemente alta para medir su posible desactivación. Aunque este estudio sobre la posible incorporación del polímero verde sea muy preliminar, sus resultados ofrecen un sistema multicolor optimizado con un gran potencial para estudiar la desactivación diferencial de fluorescencia de los distintos polielectrolitos por los explosivos.

Mediante un sistema con 3 colores, se obtendrá un patrón de desactivación más complejo para analizar, por un lado, los ratios de apagamiento y, por otro, sus K_{SV} . De este modo, el sensor no solo tendrá la capacidad de detectar la presencia de un nitro-explosivo sino que, además, facilitará la identificación del mismo en muestras desconocidas, una vez sean caracterizados, aumentando así la especificidad del sistema.

5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

Tras analizar los resultados obtenidos en este Trabajo de Fin de Máster, podemos concluir que:

- Se han obtenido y caracterizado nanopartículas lipídicas fluorescentes de polifluoreno, que emiten en azul (HTMA-PFP) o en el rojo (HTMA-PFNT), para la detección de explosivos nitroaromáticos en disolución acuosa. Según la estabilidad de fluorescencia, el tamaño de nanopartícula y la sensibilidad hacia los explosivos, se ha seleccionado el DOPG como componente lipídico, y se han definido las concentraciones de síntesis de NP en $0.75 \mu\text{M}$ de polímero para las de emisión en el azul y $1.5 \mu\text{M}$ para las de emisión en el rojo.
- La fluorescencia roja y azul de las NPs se ha visto reducida en presencia del TNT, obteniendo patrones de desactivación específicos, que servirán para su detección en soluciones acuosas desconocidas. Esta reducción ha tenido lugar tanto en sistemas con NPs de emisión en un solo color, como en sistemas combinados, aunque en distinto grado. Todos los sistemas han resultado ser estables en disolución y han mostrado una señal fluorescente regular para ambas bandas.
- El sistema de NPs azules y rojas, excitado a 335 nm, ha resultado ser más sensible al TNT que las NPs por separado. Ha sido establecida como condición óptima, por su eficacia en la detección, la combinación NPs azules y rojas en proporción 1:3, respectivamente.
- El sensor es también desactivado por DNT, aunque en menor grado que por TNT, algo menos por de DNFB, y casi nada por DNBA, y el efecto en el conjunto de los cuatro explosivos es diferente en la banda azul y roja, lo que se puede utilizar como herramienta para su discriminación.
- Las NPs han sido inmovilizadas correctamente en matrices de sílice, mediante la metodología sol-gel, sin que su fluorescencia se vea afectada por el proceso. Las NPs inmovilizadas siguen siendo sensibles a los explosivos, aunque la cinética de desactivación es más lenta.
- La potencial incorporación del polímero verde al sensor resultó ser efectiva, ofreciendo un pronóstico prometedor para el desarrollo de un sensor de emisión en tres regiones del espectro, con mayor especificidad.

Como perspectiva de futuro, en próximos trabajos se optimizarán las condiciones de detección en el sistema inmovilizado (concentración de analito, relación matriz sol-gel/NP, espesor de la matriz...), para tratar de aumentar la velocidad de difusión del analito y obtener resultados de una manera más rápida y eficaz. Además, se deben realizar más estudios para confirmar que la relación de lípido/polímero y de NPs azules, verdes y rojas elegida es óptima para la detección en el sistema

inmovilizado, confirmar la idoneidad del uso de los tres polímeros para la detección y aumentar al máximo la sensibilidad ante nitro-explosivos. Una vez conseguido esto, y asegurada la reproducibilidad del método de obtención del sensor, se estudiará la respuesta del sensor inmovilizado frente a otros compuestos nitroaromáticos y se determinará si el dispositivo puede ser reversible, es decir, si después de su uso puede ser lavado y usado de nuevo.

Finalmente, la idea es proceder con la completa caracterización del patrón de desactivación de fluorescencia causado por cada nitro-explosivo, estudiando muestras en distintos tipos de medio (agua dulce o salada e incluso vapor), para establecer una guía de referencia en el uso del sensor ante muestras desconocidas.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Chang, C.-P., Chao, C.-Y., Huang, J. H., Li, A.-K., Hsu, C.-S., Lin, M.-S., Hsieh, B. R., & Su, A.-C. (2004). Fluorescent conjugated polymer films as TNT chemosensors. *Synthetic Metals*, *144*(3), 297–301. doi: 10.1016/J.SYNTHMET.2004.04.003
- Chen, S., Zhang, Q., Zhang, J., Gu, J., & Zhang, L. (2010). Synthesis of two conjugated polymers as TNT chemosensor materials. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *149*(1), 155–160. doi: 10.1016/J.SNB.2010.06.007
- Crosley, M. S., & Yip, W. T. (2017). Silica Sol–Gel Optical Biosensors: Ultrahigh Enzyme Loading Capacity on Thin Films via Kinetic Doping. *The Journal of Physical Chemistry B*, *121*(9), 2121–2126. doi: 10.1021/acs.jpcc.6b10949
- Dave, B. C., Dunn, B., Valentine, J. S., & Zink, J. I. (1994). Sol-gel encapsulation methods for biosensors. *Analytical Chemistry*, *66*(22), 1120A–1127A. doi: 10.1021/ac00094a001
- Dhandole, L. K., Chung, H.-S., Ryu, J., & Jang, J. S. (2018). Vertically Aligned Titanate Nanotubes Hydrothermally Synthesized from Anodized TiO₂ Nanotube Arrays: An Efficient Adsorbent for the Repeatable Recovery of Sr Ions. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, *6*(12), 16139–16150. doi: 10.1021/acssuschemeng.8b02805
- Ding, L., Liu, Y., Cao, Y., Wang, L., Xin, Y., & Fang, Y. (2012). A single fluorescent self-assembled monolayer film sensor with discriminatory power. *Journal of Materials Chemistry*, *22*(23), 11574. doi: 10.1039/c2jm30697b
- Dunn, B., & Zink, J. I. (1991). Optical properties of sol–gel glasses doped with organic molecules. *J. Mater. Chem.*, *1*(6), 903–913. doi: 10.1039/JM9910100903
- Edmiston, P. L., Campbell, D. P., Gottfried, D. S., Baughman, J., & Timmers, M. M. (2010). Detection of vapor phase trinitrotoluene in the parts-per-trillion range using waveguide interferometry. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *143*(2), 574–582. doi: 10.1016/J.SNB.2009.09.059
- Ellerby, L., Nishida, C., Nishida, F., Yamanaka, S., Dunn, B., Valentine, J., & Zink, J. (1992). Encapsulation of proteins in transparent porous silicate glasses prepared by the sol-gel method. *Science*, *255*(5048), 1113–1115. doi: 10.1126/science.1312257
- George P. Anderson, *, †, Solimar C. Moreira, ‡, Paul T. Charles, †, Igor L. Medintz, †, Ellen R. Goldman, †, Mazyar Zeinali, † and, & Taitt†, C. R. (2006). *TNT Detection Using Multiplexed Liquid Array Displacement Immunoassays*. doi: 10.1021/AC051995C
- Ghasemi, F., & Hormozi-Nezhad, M. R. (2019). Determination and identification of nitroaromatic explosives by a double-emitter sensor array. *Talanta*, *201*, 230–236. doi: 10.1016/j.talanta.2019.04.012
- Hakansson, K., Coorey, R. V., Zubarev, R. A., Talrose, V. L., & Hakansson, P. (2000). Low-mass ions observed in plasma desorption mass spectrometry of high explosives. *Journal of Mass Spectrometry*, *35*(3), 337–346. doi: 10.1002/(SICI)1096-9888(200003)35:3<337::AID-JMS940>3.0.CO;2-7
- Haynes, W. M. (n.d.). *CRC Handbook of Chemistry and Physics* (F. Boca Raton (ed.); 91st ed.). CRC Press Inc.
- Kahveci, Z., Martínez-Tomé, M., Esquembre, R., Mallavia, R., & Mateo, C. (2014). Selective Interaction of a Cationic Polyfluorene with Model Lipid Membranes: Anionic versus

Zwitterionic Lipids. *Materials*, 7(3), 2120–2140. doi: 10.3390/ma7032120

- Kahveci, Z., Martínez-Tomé, M. J., Mallavia, R., & Mateo, C. R. (2013). Use of the Conjugated Polyelectrolyte Poly{[9,9-bis(6'-N, N, N-trimethylammonium)hexyl]fluorene-phenylene} Bromide (HTMA-PFP) as a Fluorescent Membrane Marker. *Biomacromolecules*, 14(6), 1990–1998. doi: 10.1021/bm400348n
- Kahveci, Z., Martínez-Tomé, M. J., Mallavia, R., & Mateo, C. R. (2017). Fluorescent Biosensor for Phosphate Determination Based on Immobilized Polyfluorene–Liposomal Nanoparticles Coupled with Alkaline Phosphatase. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 9(1), 136–144. doi: 10.1021/acsami.6b12434
- Kahveci, Z., Vázquez-Guilló, R., Martínez-Tomé, M. J., Mallavia, R., & Mateo, C. R. (2016). New Red-Emitting Conjugated Polyelectrolyte: Stabilization by Interaction with Biomolecules and Potential Use as Drug Carriers and Bioimaging Probes. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 8(3), 1958–1969. doi: 10.1021/acsami.5b10167
- Khayamian, T., M, T., & MT, J. (2003). Analysis of 2,4,6-trinitrotoluene, pentaerythritol tetranitrate and cyclo-1,3,5-trimethylene-2,4,6-trinitramine using negative corona discharge ion mobility spectrometry. *Talanta*, 59(2), 327–333. doi: 10.1016/S0039-9140(02)00521-0
- Kovacic, P., & Somanathan, R. (2014). Nitroaromatic compounds: Environmental toxicity, carcinogenicity, mutagenicity, therapy and mechanism. *Journal of Applied Toxicology*, 34(8), 810–824. doi: 10.1002/jat.2980
- Kovalev, I. S., Taniya, O. S., Slovesnova, N. V., Kim, G. A., Santra, S., Zyryanov, G. V., Kopchuk, D. S., Majee, A., Charushin, V. N., & Chupakhin, O. N. (2016). Fluorescent Detection of 2,4-DNT and 2,4,6-TNT in Aqueous Media by Using Simple Water-Soluble Pyrene Derivatives. *Chemistry, an Asian Journal*, 11(5), 775–781. doi: 10.1002/asia.201501310
- Krausa, M., & Schorb, K. (1999). Trace detection of 2,4,6-trinitrotoluene in the gaseous phase by cyclic voltammetry. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 461(1–2), 10–13. doi: 10.1016/S0022-0728(98)00162-4
- Lasic, D. . (1990). On the thermodynamic stability of liposomes. *Journal of Colloid and Interface Science*, 140(1), 302–304. doi: 10.1016/0021-9797(90)90348-R
- Leca-Bouvier, B. D., Sassolas, A., & Blum, L. J. (2014). Polyluminol/hydrogel composites as new electrochemiluminescent-active sensing layers. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406(23), 5657–5667. doi: 10.1007/s00216-014-7945-y
- Leong, J., Seo, Y., Chu, S.-H., Park, C., Jeon, E. J., Cho, S.-W., Yang, Y. Y., DiPietro, L. A., Kim, D. H., & Kong, H. (2018). Pore Diameter of Mesoporous Silica Modulates Oxidation of H₂O₂-Sensing Chromophore in a Porous Matrix. *Langmuir : The ACS Journal of Surfaces and Colloids*, 34(38), 11242–11252. doi: 10.1021/acs.langmuir.8b00957
- Liu, T., Zhao, K., Liu, K., Ding, L., Yin, S., & Fang, Y. (2013). Synthesis, optical properties and explosive sensing performances of a series of novel π -conjugated aromatic end-capped oligothiophenes. *Journal of Hazardous Materials*, 246–247, 52–60. doi: 10.1016/j.jhazmat.2012.11.010
- Malik, A. H., Hussain, S., Kalita, A., & Iyer, P. K. (2015). Conjugated Polymer Nanoparticles for the Amplified Detection of Nitro-explosive Picric Acid on Multiple Platforms. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 7(48), 26968–26976. doi: 10.1021/acsami.5b08068
- NTP, Institute of Environmental Health Sciences, N. I. of H. (1992). 2,4-DINITROFLUOROBENZENE / CAMEO Chemicals / NOAA. Retrieved from

<https://cameochemicals.noaa.gov/chemical/20272>

- O'Neil, M. J. (2006). *an Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*. Whitehouse Station, NJ: Merk and Co.
- Patty's Industrial Hygiene and Toxicology. Volume 2E: Toxicology, Fourth Edition (Clayton, George D.; Clayton, Florence E.). (1995). *Journal of Chemical Education*, 72(5), A109. doi: 10.1021/ed072pA109.6
- PE, Shaw., & PL, Burn. (2017). Real-time Fluorescence Quenching-Based Detection of Nitro-Containing Explosive Vapours: What Are the Key Processes? *Physical Chemistry Chemical Physics : PCCP*, 19(44), 29714–29730. doi: 10.1039/C7CP04602B
- Phelan, J. M., & Barnett, J. L. (2001). Phase Partitioning of TNT and DNT in Soils. In Other Information: PBD: 1 Feb 2001. Albuquerque, NM, and Livermore, CA (United States): Sandia National Laboratories. doi: 10.2172/780293
- Rubio-Camacho, M., Alacid, Y., Mallavia, R., Martínez-Tomé, M. J., & Mateo, C. R. (2019). Polyfluorene-Based Multicolor Fluorescent Nanoparticles Activated by Temperature for Bioimaging and Drug Delivery. *Nanomaterials*, 9(10), 1485. doi: 10.3390/nano9101485
- Ryon, M. G., & Ross, R. H. (1990). Water quality criteria for 2,4,6-trinitrotoluene. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 11(2), 104–113. doi: 10.1016/0273-2300(90)90013-2
- Salinas, Y., Martínez-Mañez, R., Marcos, M. D., Sancenón, F., Costero, A. M., Parra, M., & Gil, S. (2012). Optical chemosensors and reagents to detect explosives. *Chem. Soc. Rev.*, 41(3), 1261–1296. doi: 10.1039/C1CS15173H
- Sampling and Analytical Methods | 2,4-Dinitrotoluene (DNT)/2,4,6-Trinitrotoluene (TNT) - (Organic Method #044) | Occupational Safety and Health Administration*. (n.d.). Retrieved from <https://www.osha.gov/dts/sltc/methods/organic/org044/org044.html>
- Sandhu, S., Kumar, R., Singh, P., Mahajan, A., Kaur, M., & Kumar, S. (2015). Ultratrace Detection of Nitroaromatics: Picric Acid Responsive Aggregation/Disaggregation of Self-Assembled p-Terphenylbenzimidazolium-Based Molecular Baskets. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 7(19), 10491–10500. doi: 10.1021/acsami.5b01970
- Stenersen, J. (2004). *Chemical Pesticides Mode of Action and Toxicology*. CRC Press. doi: 10.1201/9780203646830
- Sun, X., Wang, Y., & Lei, Y. (2015). Fluorescence based explosive detection: from mechanisms to sensory materials. *Chemical Society Reviews*, 44(22), 8019–8061. doi: 10.1039/C5CS00496A
- Swager, T. M. (1998). *The Molecular Wire Approach to Sensory Signal Amplification*. doi: 10.1021/AR9600502
- Sylvia, J. M., Janni, J. A., Klein, J. D., & Spencer, K. M. (2000). Surface-Enhanced Raman Detection of 2,4-Dinitrotoluene Impurity Vapor as a Marker To Locate Landmines. *Analytical Chemistry*, 72(23), 5834–5840. doi: 10.1021/ac0006573
- Toal, S. J., Magde, D., & Trogler, W. C. (2005). Luminescent oligo(tetraphenyl)silole nanoparticles as chemical sensors for aqueous TNT. *Chemical Communications*, 43, 5465. doi: 10.1039/b509404f
- Vallejos Calzada, S. (2014). *Polímeros sensores: aplicaciones como sensores químicos en detección y cuantificación de analitos* [Universidad de Burgos]. Retrieved from <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=210109>

- Vázquez-Guilló, R., Martínez-Tomé, M., Kahveci, Z., Torres, I., Falco, A., Mallavia, R., & Mateo, C. (2018). Synthesis and Characterization of a Novel Green Cationic Polyfluorene and Its Potential Use as a Fluorescent Membrane Probe. *Polymers*, *10*(9), 938. doi: 10.3390/polym10090938
- Venkateswara Rao, A., & Bhagat, S. D. (2004). Synthesis and physical properties of TEOS-based silica aerogels prepared by two step (acid–base) sol–gel process. *Solid State Sciences*, *6*(9), 945–952. doi: 10.1016/j.solidstatesciences.2004.04.010
- W. Rudolf Seitz, C. J. and D. C. S. (1990). A Membrane For In-Situ Optical Detection of Organic Nitro Compounds Based on Fluorescence Quenching. *Anal. Chim. Acta.*, *237*. Retrieved from <https://apps.dtic.mil/dtic/tr/fulltext/u2/a244261.pdf>
- Wagh, P. ., Beggag, R., Pajonk, G. M., Venkateswara Rao, A., & Haranath, D. (1999). *Material Chemical Physics*.
- Wang, L., Zhou, W., Tang, Q., Yang, H., Zhou, Q., & Zhang, X. (2018). Rhodamine-Functionalized Mechanochromic and Mechanofluorescent Hydrogels with Enhanced Mechanoresponsive Sensitivity. *Polymers*, *10*(9), 994. doi: 10.3390/polym10090994
- Yeagle, P. L., & Yeagle, P. L. (2016). Lipid–Protein Interactions in Membranes. *The Membranes of Cells*, 291–334. doi: 10.1016/B978-0-12-800047-2.00012-7