



UNIVERSIDAD DE CASTILLA-LA MANCHA

Facultad de Ciencias y Tecnologías Químicas

Departamento de Química Analítica y Tecnología de Alimentos

Área de Química Analítica

**ESTRATEGIAS ANALÍTICAS ORIENTADAS A LA
NANOCIENCIA Y NANOMETROLOGÍA EN LOS
ÁMBITOS ALIMENTARIO Y MEDIOAMBIENTAL**

Memoria presentada por

Esther Pinilla Peñalver

para optar al grado de

Doctor en Ciencias Químicas

Ciudad Real, 2022

ESTRATEGIAS ANALÍTICAS ORIENTADAS A LA NANOCIENCIA Y NANOMETROLOGÍA EN LOS ÁMBITOS ALIMENTARIO Y MEDIOAMBIENTAL



Supervisado por:

**RIOS
CASTRO
ANGEL -
05131650M**

Firmado
digitalmente por
RIOS CASTRO ANGEL
- 05131650M
Fecha: 2022.07.13
18:25:19 +02'00'

Fdo.: **Dr. D. Ángel Ríos Castro**

Catedrático de Universidad

Universidad de Castilla-La Mancha

**CONTENTO
SALCEDO
ANA
MARIA -
05904324V**

Firmado
digitalmente por
CONTENTO
SALCEDO ANA
MARIA -
05904324V
Fecha: 2022.07.13
11:33:11 +02'00'

Fdo.: **Dra. D^a. Ana M^a Contento
Salcedo**

Profesora Titular de Universidad

Universidad de Castilla-La Mancha

Trabajo presentado para optar al grado de Doctor en Química

**PINILLA
PEÑALVER
ESTHER -
03899813W**

Firmado
digitalmente por
PINILLA PEÑALVER
ESTHER - 03899813W
Fecha: 2022.07.13
18:34:29 +02'00'

Fdo.: **Esther Pinilla Peñalver**

Máster de Investigación en Química



D. GREGORIO CASTAÑEDA PEÑALVO, profesor Titular de Universidad y secretario del Departamento de Química Analítica y Tecnología de Alimentos de la Universidad de Castilla-La Mancha.

CERTIFICA:

Que el presente trabajo de investigación titulado “ESTRATEGIAS ANALÍTICAS ORIENTADAS A LA NANOCIENCIA Y NANOMETROLOGÍA EN LOS ÁMBITOS ALIMENTARIO Y MEDIOAMBIENTAL” constituye la Tesis Doctoral que presenta D^a. Esther Pinilla Peñalver para aspirar al grado de Doctor en Química, y que ha sido realizada en el Departamento de Química Analítica y Tecnología de Alimentos de la Universidad de Castilla-La Mancha, cumpliendo todos los requisitos necesarios bajo la dirección del Dr. D. Ángel Ríos Castro y la Dra. D^a. Ana M^a Contento Salcedo.

Y para que así conste, expido y firmo el presente certificado en Ciudad Real a 13 de Julio de 2022.

V^oB^o

RODRIGUEZ
MARTIN -
DOIMEADIOS
ROSA DEL
CARMEN -
70646852Y

Firmado digitalmente
por RODRIGUEZ
MARTIN - DOIMEADIOS
ROSA DEL CARMEN -
70646852Y
Fecha: 2022.07.14
02:24:21 +02'00'

Fdo.: **Dra. D^a. Rosa del Carmen
Rodríguez Martín-Doimeadios**

Directora del Departamento

Firmado
digitalmente por
CASTAÑEDA
PEÑALVO GREGORIO
- 05902446W
Fecha: 2022.07.13
12:57:35 +02'00'

Fdo.: **Dr. D. Gregorio Castañeda
Peñalvo**

Secretario del Departamento

A mis abuelos

“No vayas donde te lleve el camino. Ve donde no hay ninguno y deja tu huella”

Ralph Waldo Emerson.

AGRADECIMIENTOS/ACKNOWLEDGEMENTS

Agradezco al **Ministerio de Economía y Competitividad** la concesión de un contrato predoctoral (Formación de Personal Investigador, FPI) “BES-2017-080357” asociado al Proyecto “CTQ2016-78793-P” que ha hecho posible mi dedicación a la presente Tesis Doctoral durante los últimos cuatro años.

Asimismo, agradezco al **Ministerio de Economía y Competitividad** la financiación recibida a través de los Proyectos “CTQ2016-78793-P” y “PID2019-104381GB-I00” y a la **Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha** por la correspondiente al Proyecto “SBPLY/17/180501/000262”, la cual ha permitido el desarrollo de las investigaciones realizadas durante esta Tesis Doctoral.

I am grateful to the **Ministry of Economy and Competitiveness** for granting me a predoctoral contract (Training of research staff) "BES-2017-080357" associated to the Project "CTQ2016-78793-P" that has made possible my dedication to the present Doctoral Thesis during the last four years.

I also express my gratitude to the **Ministry of Economy, Industry and Competitiveness** for the support received through the Projects "CTQ2016-78793-P" and "PID2019-104381GB-I00", as well as the **Regional Government of Castilla-La Mancha** for the corresponding Project "SBPLY/17/180501/000262" that has contributed to the development of the research of this Thesis.

ÍNDICE

Acrónimos	
Resumen.....	1
Objetivos.....	7
CAPÍTULO I. Introducción a la Nanociencia y Nanotecnología Analítica.....	11
I.1. Nanociencia y Nanotecnología Analítica.....	15
I.1.1. Criterios de clasificación de los nanomateriales.....	20
I.1.2. Métodos de fabricación de los nanomateriales.....	25
I.1.3. Características y propiedades de los nanomateriales.....	28
I.1.4. Caracterización fisicoquímica de los nanomateriales.....	36
I.1.4.1. Técnicas microscópicas.....	36
I.1.4.2. Técnicas espectroscópicas.....	38
I.1.5. Toxicidad asociada al uso de nanomateriales.....	48
I.2. Perspectivas de la Nanociencia y Nanotecnología Analítica según la participación de los nanomateriales.....	54
I.2.1. Nanomateriales como herramientas analíticas.....	54
I.2.1.1. Nanomateriales implicados en el tratamiento o preparación de la muestra.....	57
I.2.1.2. Nanomateriales implicados en el sistema de separación instrumental.....	61
I.2.1.3. Nanomateriales implicados en el proceso de detección.....	63
I.2.2. Nanomateriales como analitos.....	67
I.2.3. Nanomateriales como herramientas y objetos analíticos: contribución al desarrollo de la “tercera vía” de la Nanociencia y Nanotecnología Analítica.....	74

I.2.4. Estrategia analítica dual de los nanomateriales: una nueva perspectiva.....	87
Referencias.....	90
CAPÍTULO II. Materiales, instrumentación y procedimientos.....	117
II.1. Patrones, reactivos y muestras.....	119
II.1.1. Patrones y reactivos.....	119
II.1.2. Muestras analizadas.....	123
II.2. Dispositivos y equipos de laboratorio.....	128
II.2.1. Instrumentación.....	129
II.2.2. Otros instrumentos, aparatos y materiales.....	136
II.2.2.1. Otros instrumentos.....	136
II.2.2.2. Aparatos.....	136
II.2.2.3. Materiales.....	136
II.3. Métodos de síntesis de nanomateriales y otros procedimientos utilizados.....	137
III.3.1. Síntesis y funcionalización de nanomateriales.....	137
III.3.2. Otros procedimientos utilizados.....	148
Referencias.....	154
CAPÍTULO III. Puntos cuánticos de grafeno como herramienta en el análisis de alimentos.....	157
III.0. Compuestos con potencial actividad biológica.....	161
III.1. Discrimination between nanocurcumin and free curcumin using graphene quantum dots as a selective fluorescence probe.....	171
References.....	199

III.2. Cyclodextrin-modified graphene quantum dots as a novel additive for the selective separation of bioactive compounds by capillary electrophoresis.....	203
References.....	239
CAPÍTULO IV. Estrategias sensoras duales que utilizan aditivos alimentarios y nanomateriales.....	245
IV.0. Aditivos alimentarios.....	249
IV.1 Erythrosine B – coated gold nanoparticles as an analytical sensing tool for the proper determination of both compounds based on surface-enhanced Raman spectroscopy.....	259
References.....	293
IV.2. Development of a novel “turn-off-on” fluorescent (nano)sensor based on riboflavin emission for dual determinations of graphene oxide and catechin in fields of interest.....	299
References.....	342
CAPÍTULO V. Mejora de las propiedades del bioactivo resveratrol utilizando nanomateriales y su control analítico.....	349
V.0. Resveratrol.....	353
V.1. Graphene quantum dots an efficient nanomaterial for enhancing the photostability of <i>trans</i> -resveratrol in food samples.....	359
References.....	399
Conclusiones.....	405
Autoevaluación científica.....	411
ANEXOS.....	419
Anexo I. Publicaciones y trabajos científicos de la Tesis Doctoral.....	421
Anexo II. Contribución de la Tesis Doctoral en eventos científicos.....	423
Anexo III. Curriculum Vitae.....	427

ACRÓNIMOS/ABBREVIATIONS

0D	Zero-dimensional <i>Cero dimensional</i>	ASC	Ascorbic acid <i>Ácido ascórbico</i>
1D	One-dimensional <i>Unidimensional</i>	ATR	Attenuated total reflectance <i>Reflectancia total atenuada</i>
2D	Two-dimensional <i>Bidimensional</i>	AuNPs	Gold nanoparticles <i>Nanopartículas de oro</i>
3D	Three-dimensional <i>Tridimensional</i>	B. cereus	Bacillus cereus <i>Bacillus cereus</i>
ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt <i>Sal de diamonio 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)</i>	BDMCUR	Bisdemethoxycurcumin <i>Bisdesmetoxicurcumina</i>
AE	Adsorption efficiency <i>Eficiencia de adsorción</i>	BGE	Background electrolyte <i>Electrolito de separación</i>
AF4	Asymmetric-flow field-flow fractionation <i>Fraccionamiento de flujo de campo de flujo asimétrico</i>	Boc-EDA	N-tert-butoxycarbonyl-ethylenediamine <i>N-terc-butoxicarbonil-etilendiamina</i>
AFM	Atomic force microscopy <i>Microscopía de fuerza atómica</i>	C. albicans	Candida albicans <i>Cándida albicans</i>
AgNPs	Silver nanoparticles <i>Nanopartículas de plata</i>	CAT	Catechin <i>Catequina</i>
AMNM	Analytical metrology for nanomaterials <i>Metrología analítica para nanomateriales</i>	CCD	Charge-coupled device <i>Dispositivo de carga acoplada</i>
AN&N	Analytical Nanoscience and Nanotechnology <i>Nanociencia y Nanotecnología Analítica</i>	cd	Cyclodextrin <i>Ciclodextrina</i>
AR	Aspect ratio <i>Relación de dimensiones</i>	CDs	Carbon dots <i>Puntos de carbono</i>
		CE	Capillary electrophoresis <i>Electroforesis capilar</i>
		CECT	Spanish type culture collection <i>Colección española de cultivos tipo</i>

CGE	Capillary gel electrophoresis <i>Electroforesis capilar en gel</i>	DLS	Dynamic light scattering <i>Dispersión dinámica de luz</i>
CMC	Critical micellar concentration <i>Concentración micelar crítica</i>	DMCUR	Desmethoxycurcumin <i>Desmetoxicurcumina</i>
CMβ-cd	Carboxymethyl- β -cyclodextrin <i>Carboximetil-β-ciclodextrina</i>	DSC	Differential scanning calorimetry <i>Calorimetría diferencial de barrido</i>
CNTs	Carbon nanotubes <i>Nanotubos de carbono</i>	E. coli	Escherichia coli <i>Escherichia coli</i>
CQDs	Carbon quantum dots <i>Puntos cuánticos de carbono</i>	EBDS	Electron backscatter diffraction <i>Difracción por retrodispersión de electrones</i>
CT	Chemical or charge transfer mechanism <i>Mecanismo químico o de transferencia de carga</i>	EDS	Energy-dispersive X-ray spectroscopy <i>Espectroscopía de rayos X de energía dispersiva</i>
CT-NR	Non-radiative charge transfer mechanism <i>Mecanismo de transferencia de carga no radiativa</i>	EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid <i>Ácido etilendiaminotetraacético</i>
CT-RR	Radiative charge transfer mechanism <i>Mecanismo de transferencia de carga radiativa</i>	EE	Encapsulation efficiency <i>Eficiencia de encapsulación</i>
CUR	Curcumin <i>Curcumina</i>	EF	Enhancement factor <i>Factor de magnificación</i>
CV	Cyclic voltammetry <i>Voltametría cíclica</i>	EFSA	European Food Safety Authority <i>Autoridad Europea de Seguridad alimentaria</i>
CZE	Capillary zone electrophoresis <i>Electroforesis capilar en zona</i>	Eg	Gap energy <i>Energía gap</i>
DAD	Diode array detector <i>Detector de diodo array</i>	ELSD	Evaporative light scattering detector <i>Detector de dispersión de luz evaporativa</i>
DFT	Density functional theory <i>Teoría funcional de la densidad</i>	em	Emission <i>emisión</i>
DIC	<i>N,N'</i> -diisopropylcarbodiimide <i>N,N'</i> -diisopropilcarbodiimida		

EM	Electromagnetic mechanism <i>Mecanismo electromagnético</i>	HPLC	High performance liquid chromatography <i>Cromatografía líquida de alta resolución</i>
EOF	Electroosmotic flow <i>Flujo electrosmótico</i>	HRSEM	High-resolution scanning electron microscopy <i>Microscopía electrónica de barrido de alta resolución</i>
exc	Excitation <i>Excitación</i>	HRTEM	High-resolution transmission electron microscopy <i>Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución</i>
FDA	Food and Drug Administration <i>Administración de Alimentos y Medicamentos</i>	HSs	Hot spots <i>Puntos calientes</i>
FL	Fluorescence <i>Fluorescencia</i>	ICP-MS	Inductively coupled plasma mass spectrometry <i>Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente</i>
FT	Facial tonic <i>Tónico facial</i>	IR	Infrared <i>Infrarrojo</i>
FT-IR	Fourier-transform infrared spectroscopy <i>Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier</i>	IUPAC	International union of pure and applied Chemistry <i>Unión internacional de Química pura y aplicada</i>
GC	Gas chromatography <i>Cromatografía de gases</i>	LC	Loading capacity <i>Capacidad de carga</i>
GFAAS	Graphite furnace atomic absorption spectrometry <i>Espectrometría de absorción atómica en horno de grafito</i>	LIF	Laser-induced fluorescence <i>Fluorescencia inducida por láser</i>
GO	Graphene oxide <i>Óxido de grafeno</i>	LOD	Limit of detection <i>Límite de detección</i>
GQDs	Graphene quantum dots <i>Puntos cuánticos de grafeno</i>	LOQ	Limit of quantification <i>Límite de cuantificación</i>
GRAS	Generally recognized as safe <i>Generalmente reconocido como seguro</i>		
HOMO	High occupied molecular orbital <i>Orbital molecular ocupado más alto</i>		

LSPR	Localized surface plasmon resonance <i>Plasmón de resonancia superficial localizado</i>	NHS	<i>N</i> -hydroxysuccinimide <i>N-hidroxisuccinimida</i>
LUMO	Lowest unoccupied molecular orbital <i>Orbital molecular ocupado más bajo</i>	NMR	Nuclear magnetic resonance <i>Resonancia magnética nuclear</i>
MALS	Multiangle light scattering <i>Dispersión de luz multiángulo</i>	NMs	Nanomaterials <i>Nanomateriales</i>
MEKC	Micellar electrokinetic chromatography <i>Cromatografía electrocinética micelar</i>	NOMs	Nanostructured organic nanomaterials <i>Nanomateriales orgánicos nanoestructurados</i>
MES	4-morpholineethanesulfonic acid hydrate <i>Ácido 4-morfolinetanosulfónico hidratado</i>	NPs	Nanoparticles <i>Nanopartículas</i>
MSPE	Magnetic solid-phase extraction <i>Extracción en fase sólida magnética</i>	OES	Optical emission spectrometry <i>Espectrometría de emisión óptica</i>
MT	Mussels tissue <i>Tejido de mejillones</i>	PAAHC	Polyallylamine hydrochloride <i>Clorhidrato de polialilamina</i>
MWCNTs	Multi-walled carbon nanotubes <i>Nanotubos de carbono de pared múltiple</i>	PAHs	Polycyclic aromatic hydrocarbons <i>Hidrocarburos aromáticos policíclicos</i>
N&N	Nanoscience and Nanotechnology <i>Nanociencia y Nanotecnología</i>	PCA	Plate count agar <i>Agar de recuento en placa</i>
NCs	Nanoclusters <i>Nanoclusters</i>	PdI	Polidispersity index <i>Índice de polidispersidad</i>
NCUR	Nanocurcumin or encapsulated curcumin <i>Nanocurcumina o curcumina encapsulada</i>	PDs	Polymer dots <i>Puntos poliméricos</i>
NFs	Nanofibers <i>Nanofibras</i>	PF	Pre-concentration factor <i>Factor de preconcentración</i>
		PL	Photoluminescence <i>Fotoluminiscencia</i>
		PYR	Pyridoxine <i>Piridoxina</i>

QDs	Semiconductor quantum dots <i>Puntos cuánticos semiconductores</i>	sp	Single particle <i>Partícula única</i>
QUER	Quercetin <i>Quercetina</i>	SP	Surface plasmon <i>Plasmón superficial</i>
QY	Quantum yield <i>Rendimiento cuántico</i>	SPCEs	Screen-printed carbon electrodes <i>Electrodos serigrafados de carbono</i>
R²	Determination coefficient <i>Coefficiente de determinación</i>	SPE	Solid phase extraction <i>Extracción en fase sólida</i>
RES	Resveratrol <i>Resveratrol</i>	SQUID	Superconducting quantum interference device <i>Dispositivo superconductor de interferencia cuántica</i>
r-GO	Reduced graphene oxide <i>Óxido de grafeno reducido</i>	STM	Scanning tunneling microscopy <i>Microscopía de efecto túnel</i>
RIB	Rivoflavin <i>Riboflavina</i>	SWCNHs	Single-walled carbon nanohorns <i>Nanocuernos de carbono de pared simple</i>
RSA	Radical scavenging activity <i>Actividad de eliminación de radicales</i>	TEA	Triethylamine <i>Trietilamina</i>
RSD	Relative standard deviation <i>Desviación estándar relativa</i>	TEM	Transmission electron microscopy <i>Microscopía electrónica de transmisión</i>
S. cerevisiae	Saccharomyces cerevisiae <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	TGA	Thermogravimetric analysis <i>Análisis termogravimétrico</i>
SDS	Sodium dodecyl sulfate <i>Dodecil sulfato de sodio</i>	TiO₂	Titanium nanoparticles <i>Nanopartículas de titanio</i>
SEC	Size-exclusion chromatography <i>Cromatografía de exclusión por tamaños</i>	TOF	Time-of-flight detector <i>Detector de tiempo de vuelo</i>
SEM	Scanning electron microscopy <i>Microscopía electrónica de barrido</i>	Trolox	(±)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid <i>Ácido (±)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico</i>
SERS	Surface-enhanced Raman spectroscopy <i>Espectroscopía Raman de superficie mejorada</i>		

TSB	Trypto-Casein Soy Broth <i>Caldo Triptona-Soja</i>
TW	Tap water <i>Agua potable</i>
Tween 80	Polyoxyethylene sorbitan monooleate 80 or Polisorbate 80 / <i>Monooleato de sorbitán polioxi-etilenado 80 o Polisorbato 80</i>
UA	Uric acid <i>Ácido úrico</i>
UV-Vis	Ultraviolet-visible <i>Ultravioleta-visible</i>
Vit	Vitamin <i>Vitamina</i>
XRD	X-ray diffraction <i>Difracción de rayos X</i>
YPD	Yeast extract Peptone Dextrose <i>Extracto de levadura Peptona Dextrosa</i>

RESUMEN

La Nanotecnología ha mostrado una gran repercusión a nivel industrial, reflejando en cierta medida la atracción que provoca la capacidad de controlar la morfología y composición de la materia a escala atómica y molecular, empleando técnicas y aproximaciones muy diversas. Este control es el que permite acceder a nuevas propiedades que sólo se manifiestan a escala nanométrica o moldear a conveniencia las ya conocidas, logrando con ello la síntesis de nuevos materiales con propiedades a medida y la fabricación de nanodispositivos. Es por ello, por lo que en las últimas décadas nos encontramos en plena expansión de la Nanociencia y Nanotecnología generándose anualmente un sinnúmero de nanopartículas ya sea con propósitos comerciales o incluso como subproductos de la actividad humana de forma inintencionada. No cabe duda de que los nanomateriales en su amplia variedad de opciones son, en el momento actual, el campo de acción más relevante de la Nanoquímica y de la Ciencia de los Materiales.

La Química Analítica ha experimentado, al igual que otras áreas de la ciencia, una notable transformación gracias a las necesidades y oportunidades que proporciona la Nanociencia y Nanotecnología. La Nanotecnología está demostrando ser, cada vez más, una aliada prometedora de la Química Analítica ayudando a superar sus limitaciones, así como para la simplificación de los procesos analíticos. Sin embargo, el uso masivo de estas nanopartículas ha venido acompañado de una creciente preocupación sobre su seguridad y el consiguiente impacto que pueda producir en la salud humana, animal y el medioambiente. Por ello, el desarrollo de metodologías sensibles y selectivas que permitan el control de estos analitos en matrices complejas es crucial, convirtiéndose en un nuevo reto desde el punto de vista analítico.

En este contexto, esta Tesis Doctoral está orientada hacia el desarrollo y aplicación de nuevas estrategias analíticas en muestras alimentarias que impliquen el uso de nanomateriales en las diferentes etapas del proceso, beneficiándose de las propiedades que estas estructuras presentan con el objetivo de mejorar los métodos ya existentes o dar lugar a otros nuevos. Por otro lado, y motivados por la preocupación anteriormente mencionada, se proponen nuevas metodologías analíticas para la detección y cuantificación de nanomateriales como analitos en

matrices ambientales, después de una exhaustiva caracterización fisicoquímica de los mismos.

La parte inicial de esta Memoria, la cual constituye el Capítulo I, aborda principalmente una visión global del papel que pueden desempeñar los nanomateriales en las tres facetas claves en las que se enmarca la Nanociencia y Nanotecnología Analítica: nanomateriales como herramienta de análisis, como objeto de estudio y la combinación de ambas en el mismo proceso analítico. Conviene resaltar, que en la presente Tesis Doctoral se propone un nuevo enfoque apoyado con dos metodologías desarrolladas basadas en el doble papel con el que actúa un mismo nanomaterial, herramienta-analito o analito-herramienta, el cual hemos denominado como “*Estrategia analítica dual de los nanomateriales*”. Además, en este capítulo se detallan los conceptos básicos más importantes de los nanomateriales, en términos de características, propiedades, tipos y composición.

El Capítulo II resume los materiales, la instrumentación y los métodos de síntesis de nanomateriales que han sido utilizados para llevar a cabo el desarrollo experimental de esta Tesis.

En referencia a las nuevas contribuciones al desarrollo de la Nanociencia y Nanotecnología Analítica presentadas en esta Memoria, se han abordado diferentes aspectos. Por un lado, en el Capítulo III se detalla la síntesis y caracterización de un tipo nanomaterial basado en carbono, puntos cuánticos de grafeno, con diferente funcionalización para ser utilizado como herramienta de mejora y perfeccionamiento en las características de funcionamiento analítico de las dos metodologías analíticas que se proponen. Estas metodologías se centran en la identificación y cuantificación de compuestos potencialmente interesantes en la industria alimentaria, como son los polifenoles o las vitaminas. En la primera de las metodologías, el nanomaterial de carbono actúa como sensor fluorescente y, en la segunda de ellas, se utiliza como aditivo en el electrolito de separación para el desarrollo de un método electroforético. Además, como consecuencia de la introducción de la Nanotecnología en el sector alimentario, en los últimos años el desarrollo de sistemas nanoportadores de principios activos en alimentos para su encapsulación y liberación controlada, conocidos como sistemas orgánicos nanoestructurados, ha experimentado un gran

auge. En este sentido, además de han sintetizado y caracterizado nanomicelas del bioactivo curcumina, consiguiendo cuantificar y discriminar este nanomaterial orgánico de su análogo sin encapsular empleando señales fluorescentes. Por el contrario, en el Capítulo IV está dedicado al estudio de nanopartículas metálicas, concretamente nanopartículas de oro de diferentes tamaños y otro tipo nanomateriales de carbono, esta vez varias estructuras óxido de grafeno con diversas dimensiones, ejerciendo todas ellas como analitos en matrices ambientales. La consideración de nanomateriales como analitos en diversas matrices constituye un auténtico reto en el campo analítico, concretamente dentro de la nanometrología analítica. A su vez, estos nanomateriales han permitido el desarrollo de alternativas metodológicas en los que ellos mismos actúan como herramienta en el análisis de alimentos o derivados. El primero de los procedimientos analíticos de este capítulo utiliza la espectroscopía Raman en la que se incorporan las nanopartículas metálicas mientras que en el segundo de ellos la técnica utilizada es la espectroscopía de fluorescencia. Por último, en el Capítulo V se propone una nueva aplicación de los puntos cuánticos de grafeno, previamente sintetizados, en la mejora de la estabilidad fotoquímica del isómero biológicamente activo del polifenol resveratrol, el cual se isomeriza al ser irradiado con luz perdiendo en gran medida su bioactividad. Para el control analítico de estos isómeros, se ha hecho uso de un método electroforético previamente validado. Diferentes variables han sido exhaustivamente optimizadas para conseguir la máxima fotoprotección por parte del nanomaterial. Finalmente, se han realizado ensayos de capacidad antioxidante y de toxicidad para evaluar cómo influye dicha protección.

OBJETIVOS

La fusión de la Nanociencia y Nanotecnología con la Química Analítica ha dado lugar al progresivo desarrollo y mejora en las técnicas de identificación, separación y caracterización de compuestos de interés. No obstante, cuantiosos aspectos de la Nanociencia y la Nanotecnología están actualmente sin resolver debido a la falta de herramientas capaces de la caracterización, evaluación y determinación de especies a escala nanométrica.

El propósito general que se persigue en la presente Tesis Doctoral consiste en abordar el desarrollo y validación de nuevas estrategias analíticas que contribuyan al desarrollo de la Nanociencia y Nanotecnología Analítica. Por un lado, el estudio de los nanomateriales como potenciales herramientas analíticas para la innovación o mejora de los procesos químicos de medida en el campo de control alimentario y, por otro lado, su consideración como objeto de determinación analítica en matrices de interés medioambiental principalmente.

Con el fin de conseguir este objetivo general, se plantean varios objetivos más específicos de la investigación a desarrollar, los cuales consisten en:

1. Preparar, funcionalizar y caracterizar nanomateriales basados en carbono para su posterior utilización como herramientas analíticas conducentes a una mejora de las características de funcionamiento analítico centradas en la detección y separación de analitos de interés en matrices alimentarias. Con este fin, el objetivo es obtener una respuesta específica o selectiva al analito de interés.
2. Desarrollar y caracterizar una nanoformulación micelar para la encapsulación de un polifenol, concretamente curcumina, con el fin de aumentar su biodisponibilidad y mejorar su solubilidad acuosa, la cual es actualmente una temática emergente.
3. Contribuir al desarrollo de la nanometrología analítica donde se utilizan nanomateriales tanto como herramienta analítica como objeto de estudio en el mismo proceso analítico para la discriminación y cuantificación de nanomicelas de curcumina haciendo uso de nanopartículas de carbono fluorescentes como herramienta analítica.

4. Sintetizar y caracterizar estructuralmente nanopartículas metálicas de diversos tamaños, concretamente de oro, para su incorporación como herramienta analítica en la espectroscopía Raman y, a su vez, actuar como analito de estudio.
5. Desarrollar y optimizar una plataforma sensora a base de diferentes nanoestructuras de carbono de tamaño controlado para la detección de compuestos bioactivos. Además, evaluar la presencia del nanomaterial en muestras ambientales.
6. Proponer estrategias analíticas basadas en nanosensores duales en los que los nanomateriales puedan actuar tanto como herramienta de análisis como ser el objeto de estudio con el fin de conseguir una información mucho más amplia de los componentes del sensor.
7. Utilizar un nanomaterial basado en carbono para la mejora de las propiedades biológicamente activas de un polifenol, concretamente resveratrol, con el fin de aumentar su estabilidad química frente a la luz.
8. Desarrollar y validar métodos de separación para permitir el control analítico de los analitos a detectar.

El conjunto de estos objetivos se ha configurado, por tanto, en tres capítulos de resultados experimentales basados en cada uno de estos enfoques: (i) Puntos cuánticos de grafeno como herramienta en el análisis de alimentos, (ii) Estrategias sensoras duales que utilizan aditivos alimentarios y nanomateriales y (iii) Mejora de las propiedades del bioactivo resveratrol utilizando nanomateriales y su control analítico. En estos capítulos se ha abordado una discusión de los resultados obtenidos para llegar a las conclusiones correspondientes. Estos resultados han sido o están siendo objeto de publicaciones científicas en revistas indexadas en el JCR.

Por último, esta Tesis ha sido desarrollada en la línea de investigación del grupo denominado “Simplificación, automatización y miniaturización de procesos analíticos” en el Departamento de Química Analítica y Tecnología de Alimentos de la Universidad de Castilla-La Mancha.



Capítulo

**Introducción a la Nanociencia
y Nanotecnología Analítica**

El estudio de la Nanociencia y la Nanotecnología avanza de forma tan vertiginosa que hoy en día existe una gran variedad de nanoherramientas y nanomateriales que ofrecen interesantes aplicaciones en casi todos los campos de la ciencia y la tecnología. En particular, la disponibilidad de materiales y métodos producidos a nanoescala y las diversas posibilidades de funcionalización los convierten en materiales muy atractivos para aplicaciones de la Química Analítica. En este sentido, el capítulo introductorio de la presente Tesis Doctoral engloba cinco secciones principales. En primer lugar, se revisa el papel de la Nanociencia y la Nanotecnología desde el punto de vista analítico. Seguidamente, se describen las principales clasificaciones, aproximaciones a los métodos de síntesis, propiedades, métodos de caracterización y posibles efectos de adversos de los nanomateriales. Además, se presenta una visión general de los desarrollos actuales conseguidos mediante la explotación de las atractivas propiedades de los nanomateriales para su aplicación en el análisis de matrices complejas. Por otro lado, debido al gran número de nuevos nanomateriales que se producen continuamente, se requieren metodologías analíticas mejoradas y diseñadas específicamente para permitir la detección, cuantificación y caracterización de los nanomateriales. Esta información es clave en el control de calidad de los nanomateriales, para estudiar su comportamiento ambiental, realizar estudios de toxicidad o para un conocimiento más profundo de sus propiedades, haciendo así más eficaz su uso final. La revisión general de esta doble faceta que relaciona la Química Analítica y el nanomundo se recoge también en este primer capítulo. Para concluir, se aborda el enfoque basado en la combinación sinérgica de las dos facetas anteriores en el mismo proceso analítico, ejemplificando el uso de nanomateriales en el desarrollo de nuevas metodologías analíticas mejoradas para caracterizar, detectar o cuantificar nanomateriales, brindando especial atención a la aplicación en muestras alimentarias y ambientales. Para finalizar con la sección introductoria de la presente Memoria, se propone una nueva perspectiva, la cual puede ser incluida dentro de este ámbito, en la que los nanomateriales pueden desempeñar un papel dual en función de cuál sea su participación en el proceso analítico, ya sea como herramienta analítica o como objeto de estudio en muestras de interés.

I.1. Nanociencia y Nanotecnología Analítica

En la actualidad, la Nanociencia y la Nanotecnología (N&N) se encuentran estrechamente vinculadas a diversas áreas de investigación debido a su carácter multidisciplinar, transversal y convergente.

El término “nano” proviene del griego *νάνος*, cuyo significado es “enano” y se corresponde con la mil millonésima parte de un metro (factor 10^{-9}). Aunque Richard Zsigmondy (Premio Nobel de Química, 1925) propuso por primera vez el término “nanómetro” para caracterizar el tamaño de las partículas, la nanotecnología moderna tiene su origen en las ideas del científico Richard Feynman (Premio Nobel de Física, 1965) quien describió los potenciales beneficios de manipular la materia a escala atómica o molecular en la famosa conferencia “There’s plenty of room at the bottom” presentada en la reunión de la American Physical Society en el año 1959.¹

Años más tarde, el científico Norio Taniguchi usó por primera vez el término “Nano-tecnología” con el objetivo de diferenciar entre la tecnología llevada a cabo a escala nanométrica y a escalas superiores. Posteriormente, Eric Drexler describió en su conocido libro “Engines of creation: the next era of Nanotechnology” el diseño de una máquina nanotecnológica capaz de autorreplicarse y detectar las posibles amenazas y riesgos derivados de su fabricación, haciendo factible así las ideas visionarias de Feynman veinte años después.

No obstante, hasta finales de la década de los ochenta, con el desarrollo de algunas técnicas microscópicas como la microscopía de fuerza atómica (AFM, Atomic Force Microscopy) o la microscopía de efecto túnel (STM, Scanning Tunneling Microscopy), no se pudo comenzar a visualizar y manipular la materia a escala tan reducida. Consecuentemente, la N&N irrumpieron con fuerza como un nuevo campo científico-tecnológico revolucionario el cual permitió hechos tan significativos como el descubrimiento del fullereno² o los nanotubos de carbono (CNTs).³

Se pueden atribuir múltiples significados a la Nanociencia, pero en general se define como “la ciencia de la síntesis, análisis y manipulación de materiales a nivel atómico o molecular, donde las características o propiedades físicas o químicas son

sustancialmente diferentes a las presentadas por el mismo material a una escala mayor (micro o macrométrica)”. Por otro lado, la Nanotecnología trata “el diseño, caracterización y uso de estructuras de dispositivos y de sistemas cuya forma y tamaño se controlan en la nanoescala”.⁴ Por tanto, se establece que la N&N tienen una característica en común y es que el tamaño de los objetos de estudio está comprendido dentro de la escala nanométrica.

En 2011, la Comisión Europea publicó una recomendación relativa al concepto de nanomaterial (NM), entendiéndose como tal “un material natural, secundario o fabricado que contenga partículas dispersas o formando un agregado o aglomerado y en el que el 50% o más de las partículas en la granulometría numérica presente una o más dimensiones externas en el intervalo de tamaños comprendido entre 1 y 100 nm. En casos específicos y cuando se justifique por preocupaciones de medioambiente, salud, seguridad o competitividad, el umbral de la granulometría numérica del 50% puede sustituirse por un umbral comprendido entre el 1% y el 50%”.⁵ Además, esta definición especifica que las estructuras con una o más dimensiones externas inferiores a 1 nm, como los fullerenos, las escamas de grafeno y los nanotubos de carbono de pared simple (SWCNTs), también deben ser considerados NMs.

En este sentido, es importante diferenciar entre dos conceptos ampliamente utilizados en este ámbito como son nanopartícula (NP) y NM. Sin embargo, actualmente no existe una definición normalizada sobre ellos que permita diferenciarlos claramente.⁶ No obstante, de las definiciones ya planteadas se entiende por NP como una entidad discreta que presenta sus tres dimensiones dentro de la escala nanométrica,⁷ mientras que NM está definido como “entidad discreta que posee una o varias dimensiones del orden de 100 nm o inferiores”.⁸ En la **Figura I.1** se ilustran diferentes estructuras cuyas dimensiones, ya sea alguna o todas ellas, se encuentran dentro de la escala nanométrica.

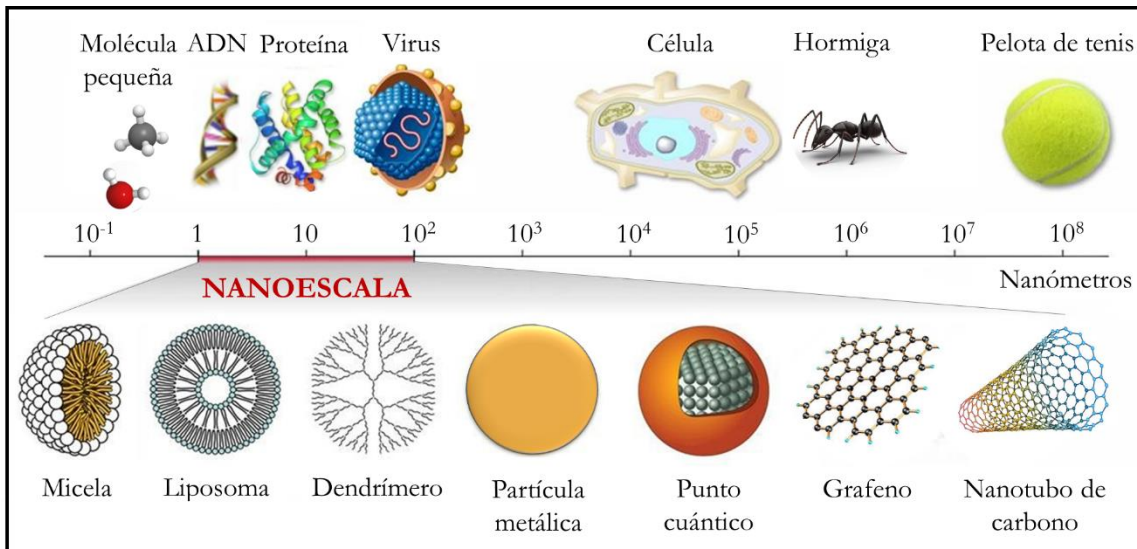


Figura I.1. Escala de medida de longitud, acentuando la nanoescala donde se sitúan las NPs y algunas de las dimensiones de los NMs. Figura adaptada de WichLab.com

A pesar de que la Nanotecnología es una disciplina de reciente aparición, durante los últimos años se ha convertido en una de las áreas de mayor crecimiento a nivel global, permitiendo la síntesis de NMs y el desarrollo de nanodispositivos con multitud de aplicaciones en una amplia variedad de sectores científicos e industriales. La física, química e ingeniería son las ramas de la ciencia más implicadas. No obstante, también existe una estrecha vinculación con otros ámbitos científicos como son la ciencia de los materiales, la biotecnología o la medicina, e industriales como el textil, el energético o el agroalimentario. Este hecho permite compartir y conectar conocimientos a partir de métodos y técnicas de diferentes campos en esta nueva disciplina. De este modo, los avances en las herramientas que ahora permiten examinar y utilizar átomos y moléculas con gran precisión, han permitido el desarrollo y sucesiva expansión de la N&N.

La riqueza científica de este campo se debe a que cuando la materia se presenta y trata a escala nanométrica, exhibe propiedades y fenómenos completamente nuevos que difieren significativamente de aquellos que se dan en sus homólogos a mayor escala debido, entre otros factores, a la elevada relación área superficial-volumen y tamaño nanoscópico.^{9, 10} Por lo tanto, es necesario conocer exactamente los cambios que experimentan las partículas a medida que disminuye su tamaño, ya que algunas de sus propiedades se ven levemente alteradas mientras que otras sufren grandes transformaciones una vez alcanzado un cierto tamaño crítico.

Dadas las propiedades únicas que presentan los NMs, la aplicación de la N&N en el área de la Química Analítica ofrece oportunidades prometedoras gracias al uso de estos materiales como potentes nanoherramientas para mejorar las propiedades analíticas de los procesos químicos de medida. Además, los desarrollos y logros básicos (Nanociencia) y aplicados (Nanotecnología) necesitan información del nanomundo para abordar el análisis de los nuevos NMs y estudiar su comportamiento y distribución cuando entran en contacto con diferentes medios, como el biológico o el medioambiente, con el fin de cumplir sus objetivos y tomar las decisiones correctas. Aquí es donde radica la importancia de la Química Analítica dentro del extenso campo de la N&N, resultando imprescindible para el análisis y caracterización de las estructuras a nanoescala. Si bien se ha producido un notable desarrollo en cuanto a técnicas y métodos para su identificación y caracterización, todavía quedan grandes problemas por resolver, convirtiéndose así en una disciplina puntera en investigación que se encuentra en pleno desarrollo. Por lo tanto, es razonable afirmar que el alcance e impacto de la Química Analítica en el mundo de la N&N ha dado como resultado la combinación de ambas facetas, dando como resultado un nuevo concepto conocido como “Nanociencia y Nanotecnología Analítica” (AN&N). Existen dos aspectos clave de la relación entre la Química Analítica y la N&N (**Figura I.2**):

- (a) La consideración de los NMs como objetos diana o de estudio (analitos). En este caso, son necesarios métodos analíticos para detectar y/o cuantificar los NMs en muestras de diferente naturaleza. Asimismo, se requiere una caracterización exhaustiva de los mismos para su incorporación en aplicaciones industriales.
- (b) La consideración de los NMs como herramientas analíticas. En este otro caso, los NMs se utilizan como herramientas para mejorar los métodos analíticos de medida existentes o incluso para desarrollar otros nuevos. Es de destacar que el tamaño y las propiedades únicas que presentan los NMs pueden ser aprovechados para desarrollar procesos innovadores de medida con el fin de abordar muchos de los problemas analíticos actuales de difícil resolución. Así, se pueden mejorar las propiedades analíticas asociadas a la calidad de la medida como la precisión, la sensibilidad o la selectividad y aquellas relacionadas con la

productividad o la reducción de costes. En definitiva, las metodologías analíticas ofrecen un rendimiento mejorado como resultado de la incorporación de nanoherramientas en el proceso analítico.

En el ámbito analítico, en función de si se explota el tamaño, las propiedades excepcionales de los NMs o ambas facetas, se pueden diferenciar tres tipos de sistemas analíticos: sistemas analíticos nanométricos, sistemas analíticos nanotecnológicos y nanosistemas analíticos.¹¹ El primero de ellos está relacionado con los dispositivos basados exclusivamente en el tamaño a nivel nanométrico sin explotar las propiedades de la estructura, pudiendo ser considerado como una tendencia de miniaturización. El segundo únicamente aprovecha las propiedades excepcionales de los NMs las cuales permiten el desarrollo y mejora de los procesos analíticos, representando los usos más actuales de la Nanociencia Analítica. Finalmente, el tercero de los sistemas explota ambos aspectos, las dimensiones y el control de las propiedades fisicoquímicas de los NMs. Este último caso se considera la mejor opción para la integración de los sistemas analíticos nanométricos (explotación del tamaño) y nanotecnológicos (explotación de las propiedades).



Figura I.2. La doble faceta de la AN&N: el efecto sinérgico entre dos ciencias.

La humanidad y el medioambiente siempre han estado expuestos a NMs producidos de forma natural, como los originados durante erupciones volcánicas o incendios forestales. Desde el comienzo de la revolución industrial, esta exposición ha aumentado significativamente debido a la presencia de fuentes antropogénicas como la combustión interna de motores, centrales térmicas y otras fuentes de termodegradación. Sin embargo, en la actualidad, la principal fuente de exposición de la sociedad a estos materiales está asociada a la existencia de nuevos NMs de origen sintético como consecuencia del rápido desarrollo de la N&N.

I.1.1. Criterios de clasificación de los nanomateriales

Existe una amplia variedad de NMs diseñados para realizar aplicaciones concretas debido a que pueden exhibir determinadas funciones. Las nanoestructuras pueden presentar diferente morfología, entre las formas se incluyen esférica, triangular, estrellada, tubular, fibrilar, espiral, laminar o incluso irregular, entre muchas otras, y con diferentes tamaños comprendidos entre 1 y 100 nm. La superficie puede ser uniforme o estar sujeta a variaciones que den como resultado una superficie irregular. Además, los NMs pueden tener una estructura cristalina o amorfa con sólidos cristalinos bien dispersos o aglomerados.¹²

Para comprender y apreciar adecuadamente la diversidad de los NMs existentes, se requiere algún tipo de clasificación. Existen diferentes criterios que abordan la clasificación de los NMs, los cuales se basan en la procedencia u origen, la homogeneidad, la naturaleza química o composición y la dimensionalidad (**Figura I.3**).

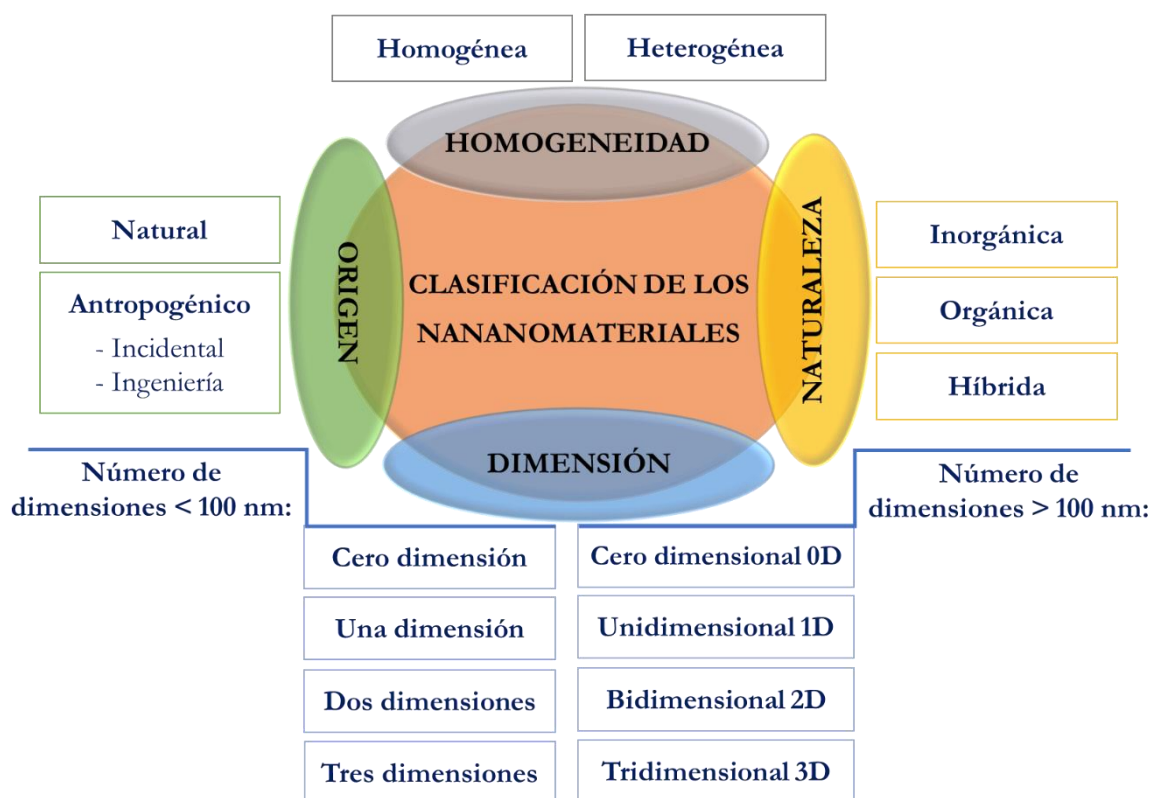


Figura I.3. Clasificación de los NMs atendiendo a criterios de origen, homogeneidad, naturaleza química y dimensionalidad.

Atendiendo a la fuente de producción u origen de los agentes productores, los NMs pueden ser de origen natural, si son generados por especies biológicas, formados como subproductos de la meteorización de minerales o por incendios forestales; o producidos por acciones antropogénicas, ya sea si son generados de forma no intencionada (incidental) como subproducto de procesos de combustión de vehículos, procesos industriales e incluso de la actividad humana, o si han sido fabricados intencionadamente y diseñados con determinadas propiedades para aplicaciones específicas. Estos últimos son los denominados NMs manufacturados o de ingeniería, también conocidos como NMs sintéticos, y son diseñados con unas propiedades definidas, caracterizándose por su dimensión, forma y composición controladas. Hoy en día existe una gran variedad de NMs sintéticos, incluyendo NPs metálicas, puntos cuánticos semiconductores (QDs), CNTs, nanofibras (NFs) o membranas nanoporosas, entre muchos otros.¹³

Otro de los criterios se basa en la homogeneidad de la nanoestructura. La homogeneidad está asociada con la composición química y las dimensiones y es

necesario conocerla tanto para estudios científicos como para aplicaciones industriales. Si los NMs tienen la misma composición química y dimensiones son homogéneos mientras que si la composición química es la misma, pero difieren sus dimensiones son heterogéneos.

Si el criterio a tener en cuenta es su naturaleza o composición química, los NMs se pueden clasificar en inorgánicos, como son las NPs, nano-óxidos o nanoclústers (NCs) metálicos, coloides de sílice o aluminio o QDs; orgánicos, tales como el grafeno, fullerenos, CNTs, nanocristales de celulosa, NPs lipídicas, NPs proteicas o NPs poliméricas; o híbridos, como QDs funcionalizados con ciclodextrinas o CNTs modificados con NPs magnéticas. Actualmente, el interés por el desarrollo de nanoestructuras híbridas, las cuales constan de dos o más tipos de nanocomponentes individuales, ha aumentado considerablemente.

No obstante, la clasificación más común de los NMs está relacionada con su dimensionalidad. Aquí se pueden hacer dos clasificaciones atendiendo tanto a las dimensiones de la nanoestructura (a escala nanométrica) como a las dimensiones del material donde están presentes las nanoestructuras. Una de ellas tiene en cuenta el número de dimensiones incluidas en la escala nanométrica (por debajo de 100 nm), dividiéndose en cero, una, dos y tres dimensiones. Esta clasificación fue propuesta por la Real Sociedad de Química (RSC) y la Real Academia de Ingeniería (RAEng). La otra clasificación se basa en el número de dimensiones que superan los 100 nm, es decir, el número de dimensiones que se encuentran por encima de la nanoescala, distinguiendo entre cero dimensional (0D), unidimensional (1D) bidimensional (2D) o tridimensional (3D).¹⁴

En relación con la segunda de las clasificaciones basadas en criterios de dimensionalidad, una nanoestructura 0D consiste en un material que presenta todas las dimensiones dentro de la escala nanométrica. Una nanoestructura 1D tiene dos dimensiones a escala nanométrica y, por tanto, solo una fuera de esa escala. Si es un material que tiene dos dimensiones por encima de la nanoescala y una de ellas por debajo de los 100 nm, se trata de una nanoestructura 2D. Finalmente, si el material no presenta ninguna dimensión de tamaño nanométrico sino que está compuesto por

un conjunto de NMs formando un material con un tamaño de escala mayor, se trata de una nanoestructura 3D, es decir, son bloques de escala nanométrica ensamblados entre sí y formando estructuras de tamaño micro/macrométrico. Por consiguiente, los nanomateriales 0D tienen sus electrones confinados en las tres dimensiones, mientras que en los materiales 3D no hay cuantización del movimiento de las partículas y, por tanto, los electrones en la banda de conducción y los huecos en la banda de valencia pueden desplazarse en todas las dimensiones de la estructura del material. A continuación, se indican algunos ejemplos de NMs en función de su dimensión:^{15, 16}

- **Cero dimensional (0D):** son conocidos como NPs e incluyen NCs, fullerenos, QDs, nanopuntos de carbono, partículas coloidales.
- **Unidimensional (1D):** también conocidos como hilos cuánticos e incluyen CNTs, NFs de carbono, nanocables, nanovarillas, NFs poliméricas.
- **Bidimensional (2D):** también conocidos como pozos cuánticos e incluyen grafeno, películas delgadas, nanoláminas, nanorecubrimientos.
- **Tridimensional (3D):** grafito, multi-nanoláminas, policristales, nanobobinas, aerogeles.

Algunos ejemplos de nanoestructuras atendiendo a esta última clasificación se ilustran en la **Figura I.4**:

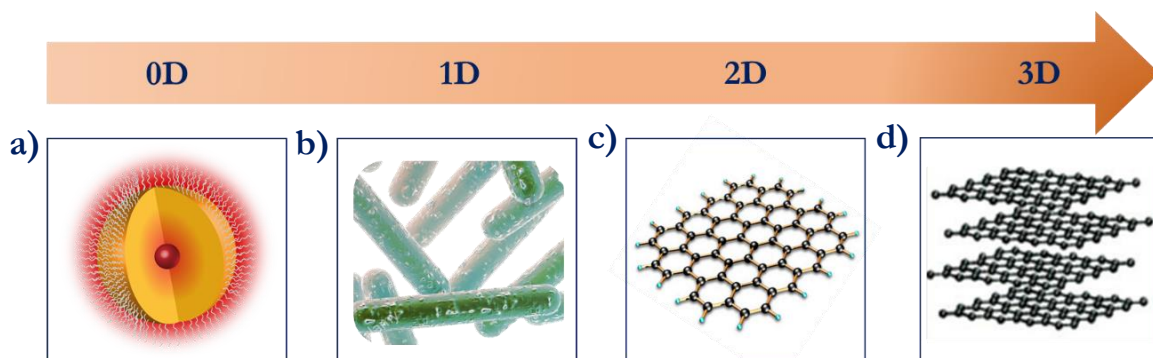


Figura I.4. Ilustración de algunos ejemplos de nanoestructuras según su dimensión: (a) QDs, (b) nanovarillas, (c) nanoláminas de grafeno y (d) grafito.

Otra clasificación alternativa de los NMs de acuerdo con su naturaleza ha sido propuesta por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (US-EPA) la cual implica cinco grupos principales (**Figura I.5**):¹⁷

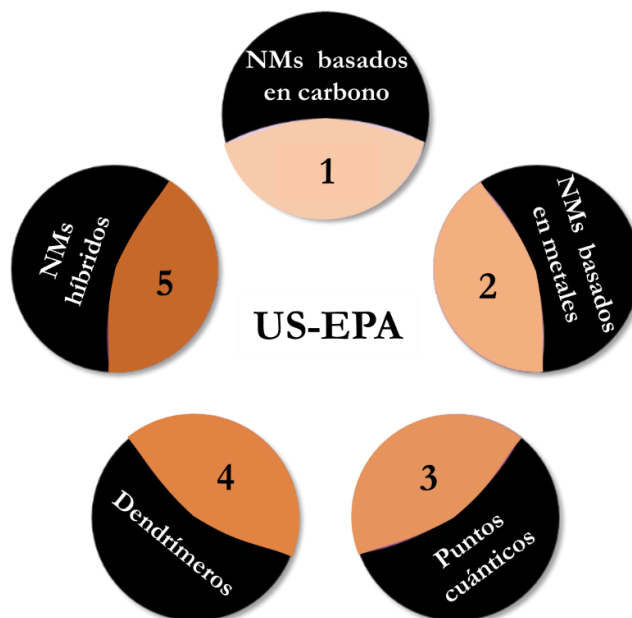


Figura I.5. Clasificación de los NMs según la US-EPA.

- **NMs basados en carbono** (naturales o sintéticos): Son estables, presentan reactividad limitada y excelente conductividad térmica y eléctrica. Normalmente, debido a su gran superficie, muchos de ellos se emplean como soporte. Algunos ejemplos de este tipo de NMs se incluyen en la **Figura I.6**.

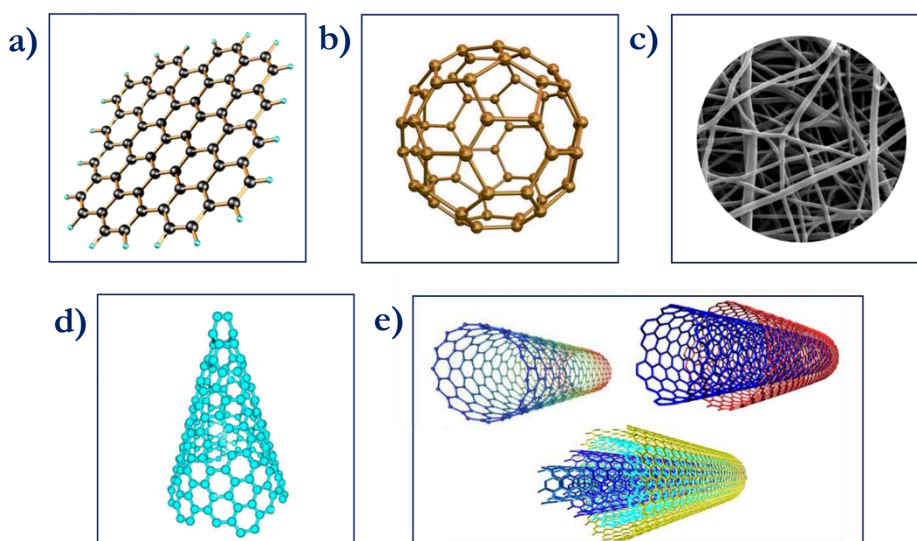


Figura I.6. Diferentes tipos de NMs basados en carbono: (a) grafeno, (b) fullereno, (c) NFs de carbono, (d) nanoconos y (e) CNTs de pared simple, doble o múltiple.

- **NMs metálicos** (naturales o sintéticos): Se caracterizan por su alta reactividad, propiedades variadas según el tipo, algunos tienen propiedades fotocatalíticas y capacidad de bloqueo ultravioleta. En algunos casos, presentan capacidad antimicrobiana lo que ha despertado interés científico desde hace muchos años y que se ha incrementado con la aparición de la pandemia COVID-19. Algunos ejemplos de NPs metálicas incluyen, NPs de oro o plata, NCs metálicos, nanoóxidos metálicos como por ejemplo de dióxido de titanio (TiO_2), óxido de zinc (ZnO) o dióxido de cerio (CeO_2).
- **Puntos cuánticos** (sintéticos): El núcleo reactivo compuesto por metales o semiconductores controla las propiedades ópticas del material. Los núcleos están rodeados por una corteza que los protege de la oxidación. Algunos ejemplos incluyen los QDs a base de seleniuro de cadmio (CdSe), telururo de cadmio (CdTe), fosfuro de indio (InP) y seleniuro de zinc (ZnSe).
- **Dendrímeros** (sintéticos): Nanoestructuras tridimensionales diseñadas para transportar moléculas encapsuladas en su interior o adheridas a la superficie. Algunos ejemplos incluyen polímeros hiperramificados al azar, polímeros arborescentes (dendrigraft) y dendrones.
- **NMs híbridos** (sintéticos): Estos NMs consisten en componentes multifuncionales los cuales presentan nuevas características eléctricas, catalíticas, magnéticas, mecánicas, térmicas o de imagen. Pueden ser diseñados a partir de dos NMs diferentes o NMs combinados con materiales de mayor tamaño. También se pueden fabricar con NMs combinados con polímeros sintéticos o resinas.

I.1.2. Métodos de fabricación de los nanomateriales

Las características de los materiales de ingeniería y, en consecuencia, sus propiedades, pueden modificarse en función del procedimiento de síntesis que se lleve a cabo. Los NMs generalmente se producen mediante dos estrategias de síntesis conocidas como procesos “descendentes o *top-down*” o “ascendentes o *bottom-up*”,¹⁸ como se esquematiza en **Figura I.7**. Según la estrategia *top-down*, se produce un

proceso de miniaturización donde las estructuras macroscópicas son reducidas a piezas más pequeñas hasta llegar a la nanoescala, generalmente de forma mecánica. Algunas técnicas físicas habituales de las que se obtiene energía para llevar a cabo las metodologías *top-down* son el fresado mecánico, la ablación láser, la litografía o la deposición por pulverización catódica, entre otras. Por el contrario, en las estrategias *bottom-up* el material se obtiene mediante la agregación de unidades de construcción más pequeñas, componentes atómicos o moleculares, para producir estructuras a nanoescala a través reacciones químicas o procesos de nucleación y crecimiento. La microemulsión, el proceso sol-gel, los procedimientos hidrotermales, la deposición física y química de vapor, las reacciones de reducción u oxidación, la síntesis por aspersión en llama o la pirólisis inducida por láser son generalmente las técnicas más empleadas para este enfoque. Ambas estrategias de síntesis se pueden realizar en estado sólido, líquido o gaseoso, así como a vacío o utilizando fluidos supercríticos.

Las metodologías *bottom-up* permiten controlar el tamaño y las propiedades de las NPs obtenidas dando como resultado estructuras de tamaño y composición homogéneo,¹⁹ mientras que es más difícil obtener dicho control utilizando el enfoque *top-down* debido a los procesos de trituración y molienda necesarios a realizar sobre los materiales macroscópicos. En general, las nanoestructuras obtenidas por ésta última vía de síntesis presentan un alto grado de polidispersidad, una mayor imperfección en la superficie de la estructura y son de mayor tamaño físico. Por lo tanto, el interés de la industria en el control de ciertas habilidades para diseñar NMs de ingeniería en función de su uso, hace que el enfoque *bottom-up* sea considerado el más prometedor. Este hecho permite la posibilidad de explotar las propiedades y comportamientos excepcionales de los NMs diseñados. Las principales características a tener en cuenta para este fin son el carácter físico, el tamaño de las partículas, la forma de las mismas, la distribución del tamaño, la composición de las partículas y el estado de agregación entre ellas.

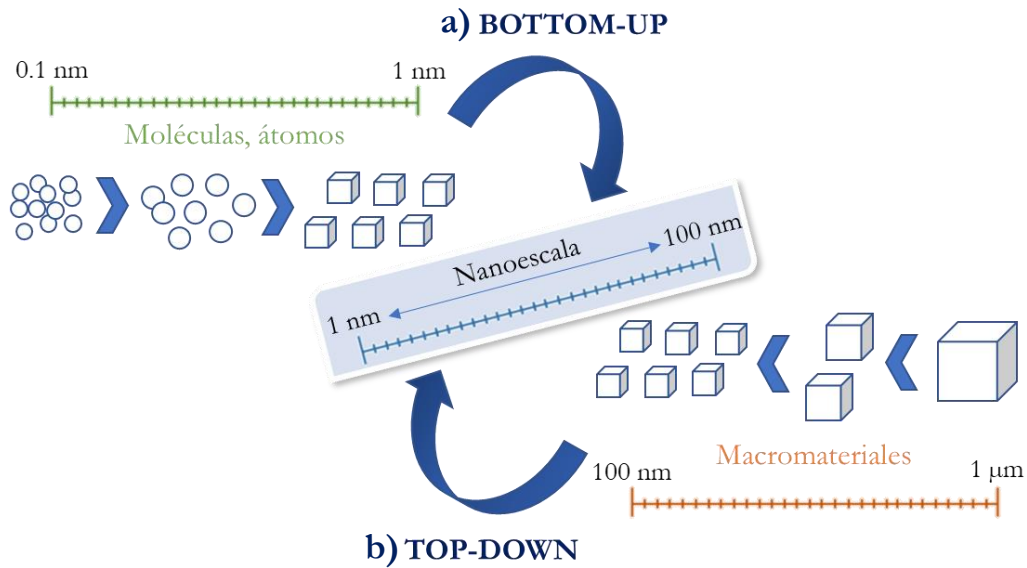


Figura I.7. Ilustración esquemática de los dos enfoques empleados en la fabricación de los NMs:

(a) *bottom-up* y (b) *top-down*.

Por tanto, atendiendo al procedimiento de síntesis, entre otros factores, se pueden diseñar NMs de tamaño y forma controlada o “a la carta” en función de la aplicación que posteriormente vayan a desempeñar. En la **Figura I.8** se ilustran nanoestructuras con diferente tamaño y forma, esférica, plana, cúbica, de varilla, de estrella, zigzag, entre muchas otras.

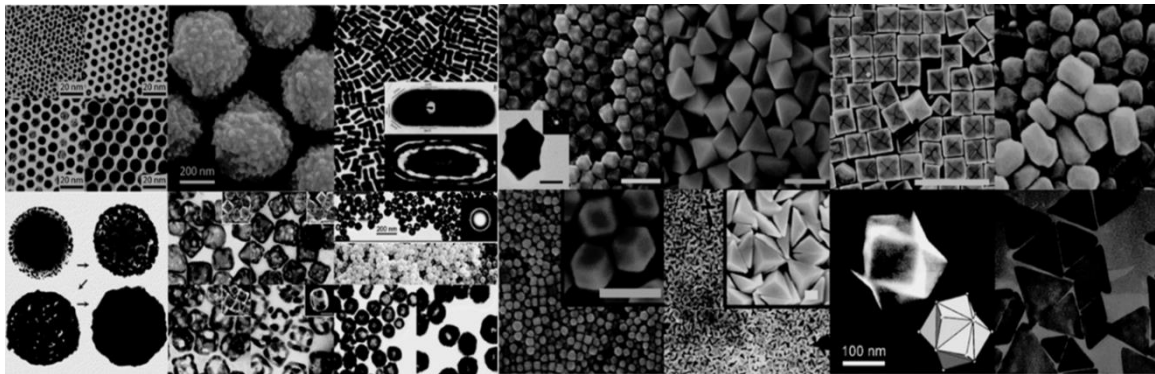


Figura I.8. Imágenes de NPs de diversa morfología vistas con un microscopio electrónico. Figura tomada de [20].

En definitiva, actualmente los procedimientos de síntesis *top-down* coexisten con los *bottom-up*, siendo estos últimos los más prometedores al ofrecer la oportunidad de obtener NMs con menos defectos y una composición química más homogénea,

así como, operar en condiciones rápidas y con un coste energético, económico y medioambiental más reducido.

I.1.3. Características y propiedades de los nanomateriales

El creciente interés por el desarrollo y la aplicación de los NMs no se debe únicamente a su tamaño ultrapequeño. Vale la pena mencionar que, a diferencia de la aparición de la N&N, los materiales a nanoescala no son algo nuevo sino que llevan con nosotros mucho tiempo, aunque no se conociese su existencia. Un ejemplo de ello, es la presencia de NPs oro y plata en las antiguas vidrieras de algunos edificios la cual se ha demostrado en las últimas décadas gracias al desarrollo de microscopios de alta resolución. Los antiguos fabricantes de vidrieras sabían que, añadiendo pequeñas cantidades de oro o plata podrían obtener colores rojos y amarillos, y es actualmente cuando sabemos que esto es debido a la presencia de NPs que en función de su morfología y composición presentarán diferentes propiedades ópticas. Los recientes avances en áreas como la microscopía y la tecnología han brindado a los científicos herramientas suficientes para conocer la fisionomía de los NMs y comprender las propiedades que ocurren naturalmente en esa escala.

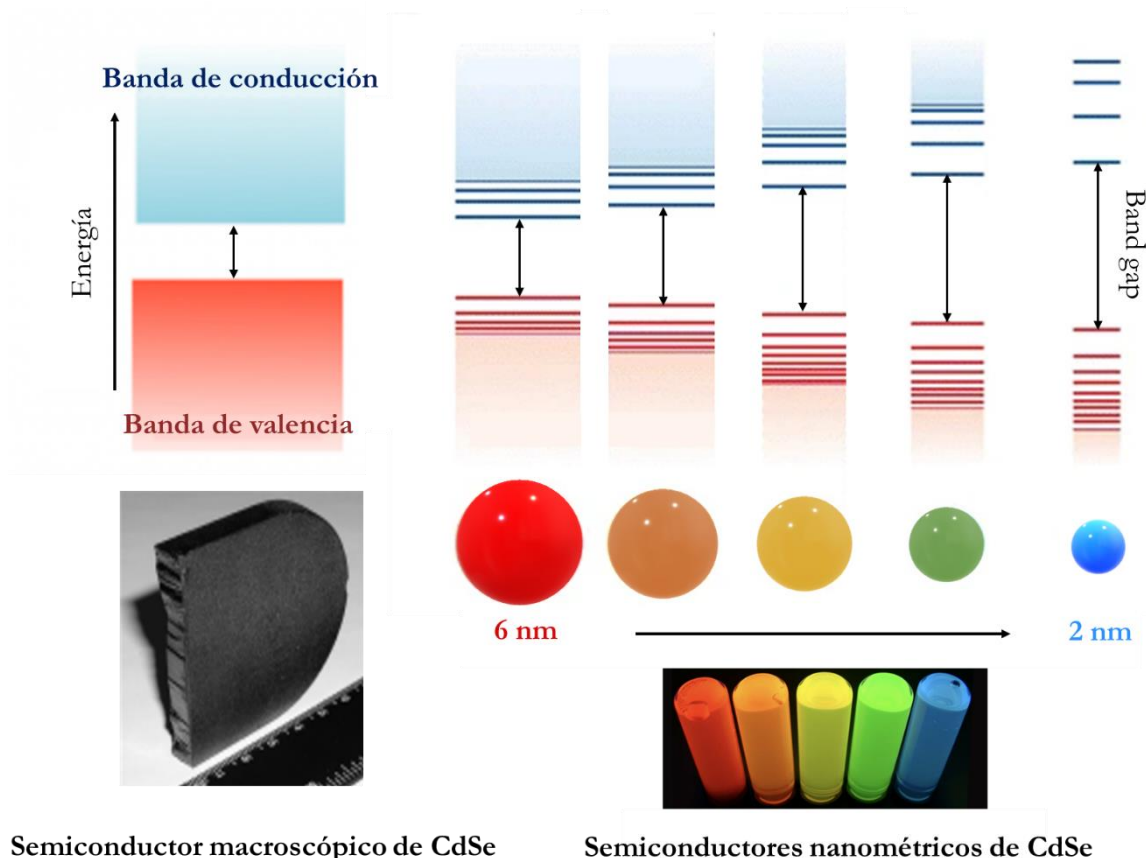
Como ya se ha indicado con anterioridad, la materia sufre grandes cambios cuando pasa de tamaño macro a nanométrico, los cuales confieren propiedades extraordinarias y únicas a las nanoestructuras, entre las que se incluyen propiedades físicas; químicas; ópticas; eléctricas; magnéticas (superparamagnetismo); mecánicas tales como la dureza, rigidez, flexibilidad, fricción, adherencia, menor densidad, resistencia a la tracción y durabilidad elevada; incluso otras particularidades de los NMs como, por ejemplo, su actividad fotocatalítica. Estos cambios son debidos principalmente a dos factores cruciales, el aumento del área superficial y el efecto del confinamiento cuántico,²¹ los cuales pueden producir cambios significativos en las propiedades fisicoquímicas, tales como reactividad, dureza y conductividad eléctrica, y llegar a dominar el comportamiento de la materia en la nanoescala. Las propiedades de los materiales a escala macroscópica son iguales para un mismo tipo de material; sin embargo, algunas propiedades de un mismo material a escala nanométrica varían con la forma y el tamaño.

En cuanto al área superficial, se ha observado que, para una masa constante de un determinado material, a medida que disminuye el tamaño de las partículas que lo constituyen se origina una redistribución de los átomos, incrementándose la fracción que se encuentra en la superficie dando lugar, por tanto, a un incremento del área superficial específica. Por ello, los comportamientos físicos y químicos de las nanoestructuras están controlados por las propiedades de la superficie. A medida que aumenta la proporción de átomos en la superficie de un material, es más probable que entren en contacto con los materiales circundantes, lo que afecta a la reactividad y a la tendencia a la aglomeración. Por ello, los NMs deben estabilizarse con grupos funcionales apropiados o inmovilizarse en soportes sólidos. En este sentido, la elevada relación superficie-volumen presente en los NMs resulta muy interesante en áreas como la catálisis,^{22, 23} pues a medida que el área superficial del material empleado como catalizador es mayor, su actividad superficial también se verá incrementada pudiendo reducir la cantidad de catalizador a utilizar, lo que tiene importantes beneficios a nivel económico y ambiental contribuyendo así al desarrollo de la Química sostenible (Green Chemistry). Además, el efecto del mayor área superficial también es responsable de otras alteraciones en las propiedades físicas de las estructuras, como es el cambio en el punto de fusión.²⁰ En este sentido, la energía total requerida para vencer las fuerzas intermoleculares es menor cuando un determinado material se encuentra en la nanoescala, ya que existe mayor relación de átomos en la superficie con respecto al interior de la estructura y, por lo tanto, el punto de fusión disminuirá al disminuir el tamaño.

En relación con el fenómeno de confinamiento cuántico, se conoce que los materiales sufren una alteración drástica de su estructura y distribución electrónica cuando alguna de sus dimensiones se encuentra por debajo de los 100 nm. Aquellos materiales que presenten al menos una de sus dimensiones a escala nanométrica se encuentran confinados cuánticamente en esa dirección, ya que el movimiento de sus electrones o pares electrón-hueco (excitones) se restringe a una región muy limitada del espacio. El confinamiento puede producirse en una, dos o en las tres direcciones espaciales o, de lo contrario, en nanoestructuras 3D no existir confinamiento cuántico, pudiendo los electrones moverse libremente por todas las direcciones del

espacio. En la dirección del confinamiento, las dimensiones espaciales son del orden de la longitud de onda de De Broglie o longitud de onda asociada al electrón. Como consecuencia del confinamiento cuántico también se manifiestan propiedades diferentes a las que presentan las partículas de mayor tamaño a base del mismo material. Es debido a este fenómeno por lo que los NMs poseen electrones de mayor energía que los materiales de mayor tamaño.²⁴

Por ejemplo, el efecto de cuantización electrónica puede hacer que algunos metales, como el bismuto, se conviertan en semiconductores a nanoescala, mientras que algunos semiconductores, como el silicio, se conviertan en aislantes, lo cual es de gran importancia para el desarrollo de componentes electrónicos. Esto se debe al cambio en el salto energético (band gap), que es la diferencia de energía que existe entre las bandas de valencia y conducción. En los materiales conductores, estas bandas de energía prácticamente se superponen y los electrones pueden pasar fácilmente a la banda de conducción. Por el contrario, en los materiales aislantes, el band gap energético es tan grande que los electrones no pueden acceder a la banda de conducción y, como consecuencia, no conducen la electricidad. En los semiconductores, el band gap energético es intermedio y, con la energía adecuada, los electrones pueden saltar a la banda de conducción, formando pares electrón-hueco. Sin embargo, los efectos de confinamiento cuántico observados en la nanoescala dan lugar a un aumento del band gap energético a medida que el tamaño del NM disminuye (**Figura I.9**),²⁵ lo que explicaría el motivo por el cual un mismo metal se convierte en semiconductor o un semiconductor en un aislante dependiendo de su tamaño cuando se encuentran a escala nanométrica.



Semiconductor macroscópico de CdSe

Semiconductores nanométricos de CdSe

Figura I.9. Representación esquemática del aumento de la energía del gap a consecuencia de la disminución del tamaño de los semiconductores de CdSe. Figura adaptada de [25].

Copyright © 2016, Springer.

En este sentido, el aumento de la energía de gap debido al confinamiento cuántico implica que será necesario absorber más energía para que se produzca el salto electrónico. Una mayor energía supone una menor longitud de onda, lo que se traduce en un desplazamiento hipsocrómico (desplazamiento hacia el azul) de las bandas de absorción y/o emisión fluorescente de las nanoestructuras a medida que disminuye su tamaño de partícula. Así, fruto de la generación de un excitón, un mismo NM (por ejemplo, QDs de CdSe) podrá emitir fluorescencia en diferentes colores en función de su tamaño, siendo las señales de emisión fluorescente muy estrechas debido a la cuantización de los niveles energéticos. Debido a estas propiedades optoelectrónicas excepcionales, se está explotando el uso de los QDs como alternativa a los colorantes convencionales en aplicaciones biomédicas²⁶ y (bio)analíticas,²⁷ e incluso se están estudiando como fuentes alternativas de emisión de luz.

Las propiedades ópticas distintivas de determinadas NPs metálicas también difieren de las de sus homólogos a mayor escala. Esto se debe al fenómeno característico que presentan denominado resonancia del plasmón de superficie localizado (LSPR). En palabras simples, cuando la luz irradia una superficie metálica, independientemente del tamaño del material, parte de la radiación se propaga a lo largo de la superficie metálica dando lugar a los denominados plasmones superficiales (SPs). Los SPs excitados constituyen una onda evanescente descrita por las oscilaciones colectivas de los electrones de conducción (**Figura I.10a**). Como resultado de ello, se induce la aparición de un campo electromagnético en dirección perpendicular a la interfase metal-dieléctrico (metal-vacío), cuya intensidad es máxima en la superficie metálica y decae exponencialmente según penetra en el dieléctrico. Cuando se genera un SP en un metal macroscópico convencional, los electrones pueden moverse libremente en el material. Por el contrario, en el caso de las NPs metálicas discretas el SP se encuentra localizado en el espacio, por lo que los electrones oscilan de forma colectiva en una zona restringida y tremendamente pequeña (**Figura I.10b**). Como resultado de la radiación, todos los electrones presentes en la NP sufren el mismo campo eléctrico siendo desplazados simultáneamente de su posición, induciéndose así la polarización de la nube electrónica de la NP. Como consecuencia, la NP queda cargada positivamente en un extremo y negativamente en el opuesto. La fuerza que se produce al perturbar la nube electrónica de su posición de equilibrio da como resultado la generación de dipolos eléctricos, en el caso de NPs pequeñas, o multipolos, si el tamaño de la partícula supera los 30 nm. Para la formación de SPs localizados, es necesario que el espacio en el que se encuentra recluida la densidad electrónica en la NP sea muy inferior a la longitud de onda de la radiación incidente (diámetro partícula $\ll \lambda$). Cuando la frecuencia de esta oscilación electrónica coincide con la frecuencia de la luz incidente, se dice que el SP está en resonancia con la radiación incidente (SPR) dando lugar a una situación de máxima absorción de la radiación y, por tanto, al fenómeno LSPR en la nanoescala.^{28, 29}

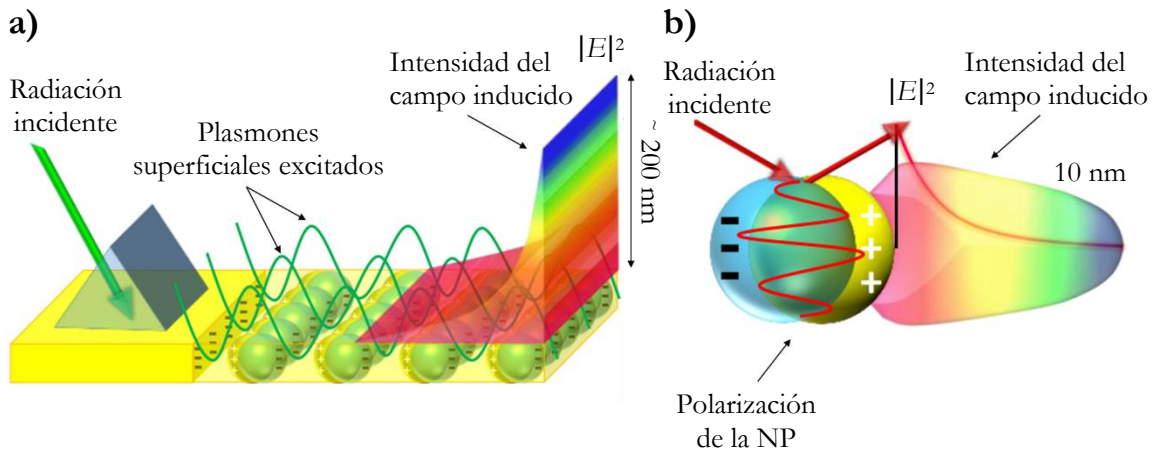


Figura I.10. Fenómeno de resonancia del SP (a) en superficie (interfase metal-dieléctrico) y (b) localizado (NPs metálicas). Figura adaptada de [29].

Por lo tanto, la energía del fenómeno LSPR es muy sensible a diferentes variables como el tamaño y la forma de la NP, pero también es muy sensible a su entorno.^{28, 30} Derivado del efecto LSPR, las NPs metálicas presentan una absorción visible muy fuerte. Como resultado, los coloides de NPs metálicas, como el oro o la plata, pueden mostrar colores que no se exhiben en su forma macroscópica, como son el rojo, azulado o naranja, según la forma, el tamaño y el medio que las rodea. Esta característica se está explotando profundamente en aplicaciones de detección óptica, donde pequeñas modificaciones en el entorno de la nanoestructura dan lugar a cambios en el LSPR y, por tanto, en el espectro asociado y color de la disolución. Por ejemplo, si un ligando, como una proteína, se adhiere a la superficie de la NP metálica, su energía LSPR se ve afectada. Otro ejemplo bien conocido de este efecto para el caso de las AuNPs es el cambio de color observado de rojo a azulado que tiene lugar tras su agregación, es decir, al variar la distancia entre NPs (**Figura I.11**).^{31, 32} Debido al fenómeno LSPR, las NPs metálicas han permitido el desarrollo de nuevos mecanismos de transducción donde la señal derivada de este fenómeno sufre una potenciación de varios órdenes de magnitud en el diseño de sensores basados fundamentalmente en técnicas ópticas (Espectroscopía UV-Vis,³³ Raman³⁴ o de fluorescencia³⁵), logrando así incrementar la sensibilidad de dichas técnicas.

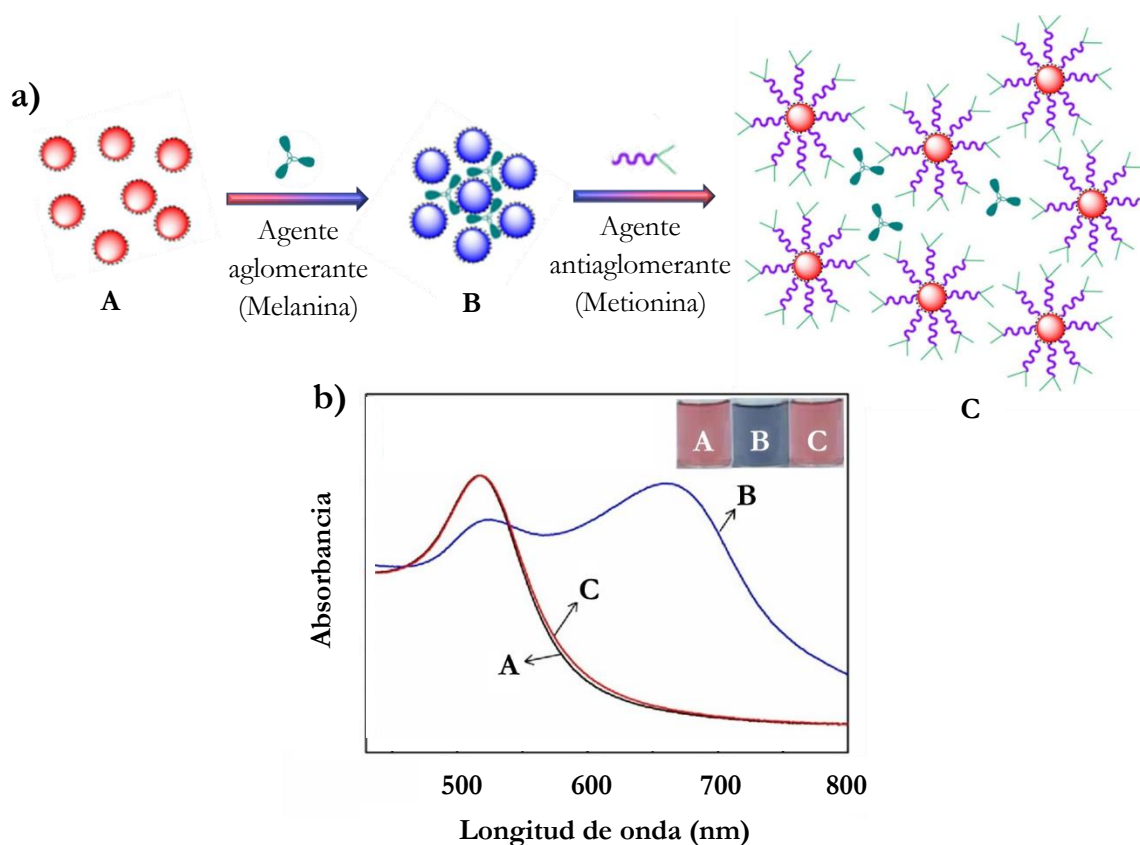


Figura I.11. (a) Ilustración del mecanismo para la detección metionina basado en la antiagregación de AuNPs, previa agregación en presencia de melanina. (b) Espectros de absorción UV-Vis y colores de las disoluciones de (A) AuNPs, (B) al inducirse la agregación o desestabilización y (C) posterior dispersión o estabilización del coloide. Figura adaptada de [32]. Copyright © 2018, Elsevier.

Las NPs metálicas de cualquier tipo se ven afectadas por el fenómeno LSPR y, por tanto, exhibirán la banda característica resultado de dicho efecto, sin embargo, para el desarrollo de este tipo de sensores, interesa que dicha banda se encuentre situada en la región visible y que la mayor parte de la radiación absorbida sea derivada en emisión lumínica no perdiéndose en forma de calor. Los metales del grupo 11 de la tabla periódica, entre los que se incluyen el cobre, la plata y el oro, superan ampliamente estos requisitos, siendo el último de ellos el más utilizado por presentar una mayor estabilidad en disolución.

En definitiva, una particularidad muy atractiva de la materia organizada a nanoescala es su capacidad para poder sintonizar las propiedades como consecuencia de los efectos del confinamiento cuántico. Es decir, simplemente con solo variar la morfología de las nanoestructuras se pueden modular y mejorar sus propiedades físicas y químicas. Por lo tanto, la modificación adecuada de las condiciones de síntesis

dará lugar a NMs con las propiedades deseadas para aplicaciones específicas, adaptándose así a la función a realizar.³⁶ Además, la reactividad es una propiedad química importante que puede ser modificada según sea necesario debido a su dependencia con el tamaño, la forma y la estructura del material.¹⁰ Dada la gran superficie reactiva de la materia a esta escala tan pequeña, los NMs pueden ser funcionalizados con una amplia variedad de ligandos, lo cual favorece la selectividad en la detección en base a las necesidades experimentales. Estas ventajas hacen que este tipo de materiales sean candidatos idóneos para multitud de aplicaciones, como la industria catalítica, óptica y electrónica, biomédica, medioambiental y alimentaria, entre muchas otras. Para concluir, la **Figura I.12** esquematiza las principales propiedades de los materiales a escala nanométrica que suelen ser explotadas para cada tipo de NP en su uso en el análisis químico. Como se puede observar, mientras que las NPs de carácter metálico y las basadas en carbono son las más versátiles, las de sílice solo explotan las propiedades químicas.

NANOPARTÍCULAS EN EL ANÁLISIS QUÍMICO					
Propiedades explotadas	Sílice Sílice mesoporosa	Metálicas Metales nobles Óxidos metálicos Puntos cuánticos	Carbono Nanotubos Nanopuntos Fullerenos	Poliméricas Polímeros de impresión molecular	Nano-formulaciones Lípidos Polisacáridos Proteínas
Químicas	**	*	**	**	**
Eléctricas	-	**	**	*	-
Ópticas	-	**	**	-	-
Térmicas	-	*	*	-	-
Magnéticas	-	**	-	-	-

Figura I.12. Correlación entre el tipo de NP y las principales propiedades explotadas con fines analíticos. El número de asteriscos indica el grado de aprovechamiento de cada propiedad. Figura adaptada de [37]. Copyright © 2011, Elsevier.

I.1.4. Caracterización fisicoquímica de los nanomateriales

Una adecuada caracterización química y estructural de los materiales a escala nanométrica es necesaria tanto para evaluar la calidad de la síntesis como para una mejor comprensión de la relación entre su estructura y propiedades. Además, es prioritaria tanto para entender sus interacciones con posibles analitos como para evaluar su seguridad.

Desde el punto de vista de su aplicación analítica, algunos de los parámetros fisicoquímicos de mayor interés son el tamaño y distribución de tamaños, forma, área superficial y sus características, estado de agregación, potencial Z, solubilidad en distintos medios y propiedades intrínsecas tales como propiedades ópticas y magnéticas. Los resultados obtenidos de la caracterización generalmente son el promedio de una población de partículas.³⁸⁻⁴⁰ Las técnicas de caracterización más útiles basadas en microscopía y espectroscopía se detallan a continuación.

I.1.4.1. Técnicas microscópicas

Frecuentemente, debido a su reducido tamaño, la caracterización de las NPs no es viable mediante microscopía óptica, por lo que se requiere de la microscopía electrónica para la obtener información acerca del tamaño y forma de las mismas.⁴¹ Las técnicas de microscopía electrónica más comúnmente utilizadas como la microscopía electrónica de transmisión (TEM), la microscopía electrónica de barrido (SEM), la microscopía electrónica de transmisión de barrido (STEM, combinación de las dos anteriores), criomicroscopía electrónica (cryo-EM), o sus variantes de alta resolución, y las microscopías de fuerza atómica (AFM) y de efecto túnel (STM) son muy útiles para caracterizar la morfología de las partículas, permitiendo además determinar su estado de agregación. Si estas microscopías se combinan con un espectrómetro de energía dispersiva de rayos X (EDS o EDX) se puede obtener de forma simultánea información sobre la composición química elemental de los materiales.

- **TEM.** Esta técnica proporciona imágenes directas e información de las nanoestructuras con una resolución espacial que llega hasta el nivel de las dimensiones

atómicas (< 1 nm).⁴² En el modo TEM convencional, un haz de electrones incidente se transmite a través de una muestra ultrafina a través de la cual viajan los electrones, obteniéndose una imagen a partir de los electrones que atraviesan la muestra.⁴³

En bibliografía existen numerosos ejemplos en los que se recoge el estudio de diferentes NPs a través de análisis TEM. Algunos ejemplos de aplicaciones de AuNPs en las que se emplea esta técnica incluyen una síntesis biogénica con actividad anticancerígena⁴⁴ o a la degradación de AuNPs después de una inyección intraperitoneal en ensayos in vivo.⁴⁵ Otros ejemplos reportados para NPs basadas en carbono consisten en el control de la síntesis a partir de grafito mediante ablación láser en medio líquido⁴⁶ o la evaluación del comportamiento de litación de NPs de silicio unidas y alojadas en una matriz de NFs de carbono.⁴⁷

- **SEM.** Es una técnica de formación de imagen de superficie que utiliza un haz de electrones, los cuales impactan con la superficie de la muestra e interactúan con ella para generar señales que reflejan detalles de alrededor de 1 a 5 nm de la topografía superficial de la muestra.⁴⁸ El tamaño, la distribución de tamaños y la forma de las nanoestructuras se pueden adquirir directamente usando la técnica SEM. Para la formación de la imagen, a diferencia de TEM que utiliza los electrones que penetran la muestra estudiada, en SEM se emplean aquellos electrones que son principalmente reflejados en la superficie. El microscopio TEM generalmente usa haces de electrones más potentes que SEM y, por lo tanto, tiene una resolución más alta proporcionando mayor grado de detalle a escala atómica, como información sobre la estructura cristalina y la granularidad de una muestra.⁴¹

- **Cryo-EM.** Algunas nanoestructuras deben conservar su hidratación para evitar alterar su estructura original. Este problema se solventa manteniendo la muestra congelada mediante el uso de la modalidad cryo-TEM/SEM empleando una platina criogénica en el microscopio a alto vacío. Por lo tanto, no es necesaria la alteración de la muestra con ningún tratamiento químico para la inmovilización de la muestra debido a la fijación física por congelación.⁴⁹

- **AFM.** Es una tecnología de microscopía poderosa y versátil que se utiliza para estudiar muestras a micro o nanoescala.⁵⁰ En esta técnica se utiliza un cantiléver

micromecanizado con una punta afilada para escanear la superficie de la muestra y generar una imagen de la misma. La imagen es el resultado de las desviaciones del cantiléver de la superficie debido a la repulsiones electrostáticas y de van del Waals que se producen entre átomos del metal presentes en la punta y los de la superficie del material de medida.^{48, 51} Al igual que TEM y SEM, la técnica AFM se puede utilizar para estudiar el tamaño, forma, estructura, dispersión y agregación de NPs. Igualmente, permite evaluar la rugosidad de la superficie y visualizar su textura en muchos tipos de material. Además, es una técnica no destructiva y tiene una alta resolución espacial tridimensional. A modo de ejemplo, empleando esta técnica se ha estudiado la cinética del crecimiento las AuNPs producidas mediante el método Turkevich.⁵²

- **STM.** Permite la identificación de los átomos y moléculas que componen las nanoestructuras. STM puede operar a ultra alto vacío lo que permite la caracterización de las muestras en forma de suspensiones líquidas y gaseosas.⁵³

Todas estas técnicas se limitan a proporcionar información sobre parámetros físicos como el tamaño, la forma, el estado de aglomeración o la superficie. Además, las técnicas de microscopía electrónica presentan varios inconvenientes, como la limitada resolución espacial para algunas de ellas, la generación de artefactos o la falta de representatividad. Concretamente, TEM y SEM presentan la necesidad de secado de la muestra previo al análisis. Además, las dimensiones de la punta del cantiléver en AFM generalmente son mayores que las de las estructuras a estudiar, lo que en algunas ocasiones puede conllevar una sobreestimación de las dimensiones laterales de las muestras.^{49, 53}

I.1.4.2. Técnicas espectroscópicas

Además de las técnicas de microscopía electrónica, las técnicas basadas en la dispersión de la luz, entre las que se incluye la dispersión dinámica de la luz (DLS, Dynamic Light Scattering), son muy adecuadas para conseguir información acerca de la distribución de tamaños en las dispersiones coloidales. La técnica DLS se basa en la monitorización de la fluctuación temporal de la intensidad de dispersión elástica de la luz inducida por el movimiento térmico aleatorio que experimentan las NPs,

conocido como movimiento browniano. La relación entre la velocidad del movimiento browniano de una partícula y el tamaño de esa partícula está definida por la ecuación de Stokes-Einstein. Esta relación muestra cómo se puede determinar el tamaño a partir de la velocidad de difusión, siempre que se conozcan la temperatura y la viscosidad de la muestra. Concretamente, la fluctuación producida es equivalente al diámetro hidrodinámico de una esfera equivalente a las partículas en dispersión, suponiendo una capa de hidratación que rodea la partícula o molécula.⁴¹ DLS además proporciona detalles sobre el índice de polidispersidad y el estado de agregación de las NPs.⁴⁸

Esta técnica muestra ciertas ventajas como la corta duración del análisis, la precisión para la determinación del tamaño hidrodinámico de muestras monodispersas, la capacidad del análisis de muestras poco concentradas e incluso no es invasiva. No obstante, presenta algunas limitaciones, como la dificultad de correlacionar fracciones de tamaño con una composición particular cuando hay ciertas cantidades de agregados presentes, la interferencia de partículas de polvo presente en el ambiente en la intensidad de dispersión y la medida se limita a un rango de tamaños de entre 1 nm y 3 μm aproximadamente.⁵⁴

A menudo, los instrumentos DLS están equipados con una unidad ELS (Electrophoretic Light Scattering) mediante la que se pueden registrar medidas de dispersión de luz electroforética, que se traducen en medidas de potencial Z. Por ello, de forma simultánea, se puede determinar también la carga neta superficial de las NPs y así estimar la estabilidad de la dispersión coloidal en el medio en el que se encuentra. Los resultados más altos obtenidos de potencial Z, en valor absoluto, indican una mayor estabilidad debido a la mayor repulsión electrostática entre partículas.⁴⁸

- Las partículas tienden a la agregación en el rango de 0 – 5 mV.
- Las partículas ligeramente estables están en el rango de 5 – 20 mV.
- Las partículas moderadamente estables están en el rango de 20 – 40 mV.
- Las partículas altamente estables están en el rango superior a 40 mV.

Por otro lado, la espectroscopía Raman es una técnica utilizada para la identificación de casi cualquier material o compuesto, así como para llevar a cabo el seguimiento de las especies adsorbidas en superficie. El principio de esta técnica está basado en el fenómeno de la dispersión inelástica de la luz por la materia al incidir sobre ella un haz de luz monocromática. A diferencia de la dispersión elástica, en la dispersión inelástica existe transferencia de energía entre fotones y moléculas, por tanto, los fotones emitidos poseen frecuencias diferentes a la original. Este cambio energético proporciona información sobre las transiciones vibracionales, rotacionales y otras de baja frecuencia en las moléculas.⁵⁵ Desde el punto de vista clásico, el fenómeno Raman es producido como consecuencia de la interacción de la radiación electromagnética con la materia, dando lugar a un momento dipolar inducido debido a la polarizabilidad de las moléculas y como resultado se produce la dispersión de la luz.⁵⁶ Desde una perspectiva cuántica, el origen de este fenómeno puede ser debido a una serie de transiciones electrónicas entre el nivel electrónico estacionario o fundamental y un estado virtual no estacionario en el que la molécula excitada permanece durante un corto intervalo de tiempo para posteriormente decaer emitiendo así un fotón. Este hecho da lugar a radiación dispersa elástica e inelástica. Esta última, puede ser de tipo Stokes, si la luz incidente provoca excitación de niveles vibracionales y se obtienen fotones dispersados de menor energía, o anti-Stokes, producida cuando la desexcitación agrega energía a los fotones dispersados. Cuando la dispersión es elástica, el fenómeno se denomina dispersión de Rayleigh y ocurre cuando el fotón emitido y el incidente presentan la misma energía, es decir, no hay intercambio de energía entre los fotones incidentes y el sistema.⁵⁶⁻⁵⁸ Los tres tipos de radiación se encuentran esquematizados en la **Figura I.13**.

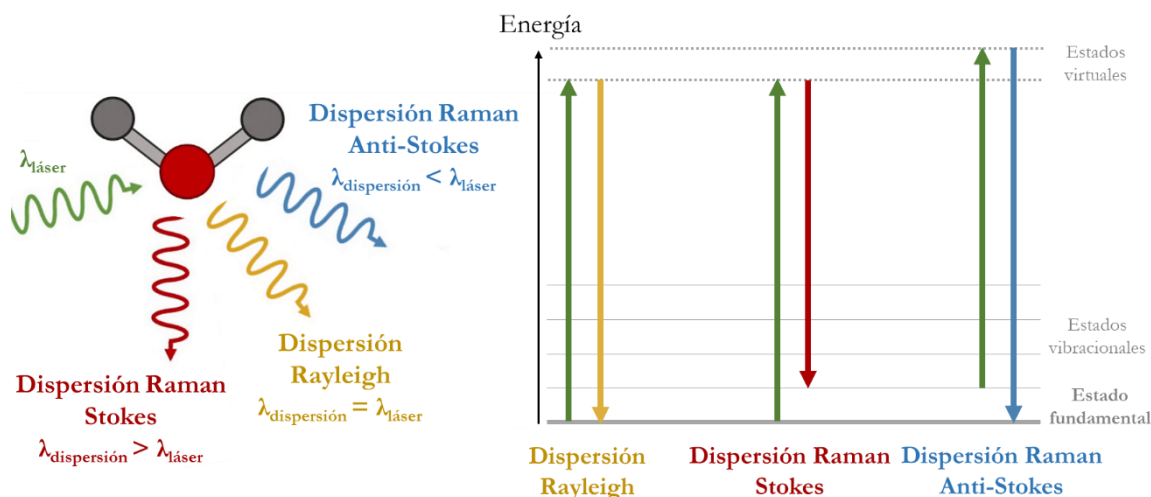


Figura I.13. Esquema de las diferentes transiciones de energía implicadas en la espectroscopía Raman.

La componente mayoritaria de la luz dispersada presenta la misma frecuencia que la luz incidente y es una pequeña fracción de ésta la que presenta un cambio frecuencial como resultado de la interacción de la luz con la materia. Mientras que la dispersión Rayleigh no aporta ninguna información sobre la muestra analizada, la luz dispersada que presenta frecuencias distintas a la de la radiación incidente es la que proporciona información sobre la composición molecular de la muestra, es decir, la dispersión Raman.

La espectroscopía Raman es una técnica muy eficiente para determinar no solo la composición química, sino también la estructura molecular de los compuestos analizados, pudiendo obtener así su "huella dactilar" para ser utilizada de forma cualitativa para la identificación de especies y/o cualitativa si la intensidad de alguna banda espectral es proporcional a la concentración de la especie.⁵⁷ Además de estas capacidades, la espectroscopía Raman es no destructiva, la muestra no necesita preparación y es una técnica muy rápida a la hora de obtener resultados. A pesar de las ventajas que presenta la espectroscopía Raman convencional, también encontramos algunas limitaciones importantes desde el punto de vista analítico.⁵⁷ Principalmente, estas limitaciones son la baja sensibilidad y la fluorescencia. Por un lado, la baja sensibilidad es debida a la reducida población susceptible de sufrir dispersión Raman, ya que sólo un fotón de cada millón que alcanzan la molécula es difundido inelásticamente, lo que genera espectros cuyas señales presentan baja

intensidad. Por otro lado, la fluorescencia emitida en algunos casos por el material analizado también es un inconveniente ya que puede enmascarar este fenómeno.^{59, 60}

No obstante, en el año 1974 se descubrió un nuevo fenómeno basado en el aumento de la dispersión inelástica procedente de determinadas especies cuando éstas se encuentran en presencia de una superficie metálica correctamente preparada.^{57, 58} Este fenómeno, conocido como SERS (por sus siglas en inglés “Surface-Enhanced Raman Scattering”) se caracteriza por mejorar extraordinariamente la intensidad de las señales Raman y la resolución espacial de determinadas especies cuando se encuentran en presencia de superficies metálicas rugosas que presenten una banda SP bien definida, la cual es necesaria para la potenciación de la señal (**Figura I.14**). Este fenómeno ha puesto un gran avance permitiendo ser aplicado a una amplia variedad de sistemas antes inaccesibles por su baja sensibilidad. A diferencia de la dispersión Raman que hasta entonces se conocía, en la que la dispersión está condicionada por la interacción entre la luz y la materia, el fenómeno SERS es debido al fuerte campo electromagnético generado sobre la nanoestructura metálica cuando se irradia con una longitud de onda apropiada dando como resultado dicha amplificación de la señal Raman de incluso hasta 12 órdenes de magnitud,^{60, 61} dependiendo de diferentes factores entre los que se incluyen la naturaleza de la molécula, la naturaleza del metal y la morfología superficial del metal. Por todo ello, la espectroscopía SERS está actualmente reconocida como una técnica de caracterización, identificación y cuantificación extremadamente sensible.⁶²⁻⁶⁴

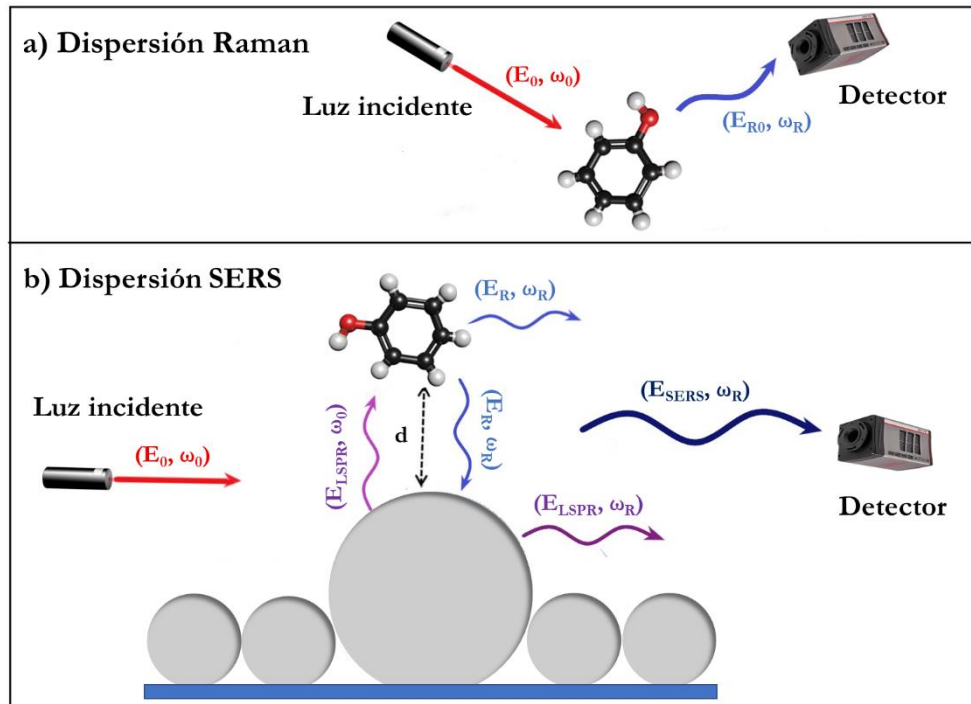


Figura I.14. Esquema de los procesos de dispersión (a) Raman y (b) SERS.

La difracción de rayos X (XRD, X-ray diffraction) es otra herramienta muy utilizada para resolver la estructura cristalina de los materiales. Esta técnica se basa en la dispersión de un haz de rayos X por parte de la materia al incidir en los planos cristalinos de una muestra según la ley de Bragg.⁶⁵ La aplicación fundamental de la XRD es la identificación cualitativa de la composición mineralógica de una muestra cristalina. Otras aplicaciones son la determinación de tamaños de cristales, la determinación del coeficiente de dilatación térmica, así como cálculos sobre la simetría del cristal y en especial la asignación de distancias a determinadas familias de planos y la obtención de los parámetros de la red. Sin embargo, su aplicabilidad se ve limitada porque sólo puede generar resultados de una única conformación. La siguiente desventaja es la baja intensidad de los rayos X difractados en comparación con las difracciones de electrones.⁶⁶

A diferencia de las anteriores técnicas espectroscópicas, la espectroscopía UV-Vis es una técnica basada en la absorción de la radiación de luz por parte de la materia y también puede utilizarse para investigar las diferentes características de las NPs, incluyendo el tamaño, la concentración, el estado de agregación y el recubrimiento de la superficie.⁶⁷⁻⁶⁹ En el caso de las NPs metálicas, cuando son irradiadas con luz puede

ocurrir el fenómeno LSPR, siendo su espectro de absorción sensible a la forma y tamaño de la partícula como se comentó anteriormente. Además, si la intensidad máxima de absorción o emisión fotoluminiscente se correlaciona linealmente con la concentración de NPs puede ser una herramienta de control analítico de forma cuantitativa.⁵⁴

La espectroscopía de absorción UV-Vis se utiliza incluso para determinar el si el proceso de síntesis ha transcurrido correctamente por desaparición o alteración de las bandas de los compuestos de partida. Por ejemplo, en el caso de las NPs plasmónicas la aparición de la banda característica del SP es indicativa de que ha se han formado correctamente tras el proceso de preparación.

Además, en el caso de las NPs plasmónicas, el número de bandas de absorción disminuye con el incremento de la simetría de la partícula. Mientras que aquellas de forma esférica presentan una única banda de absorción, las anisotrópicas presentan dos o más bandas en función de su forma (**Figura I.15a**). El tamaño de partícula también puede ser estimado en función de la longitud de onda a la cual la absorción es máxima. Generalmente, a medida que la banda sufre un desplazamiento hacia longitudes de onda mayores para un mismo tipo y morfología de nanoestructura, su tamaño se verá incrementado. Además, los fenómenos de agregación en las NPs provocan alteraciones en la fisionomía espectral, produciendo una disminución de la intensidad de la banda de absorción junto con la aparición de hombros a longitudes de onda mayores.^{30, 70}

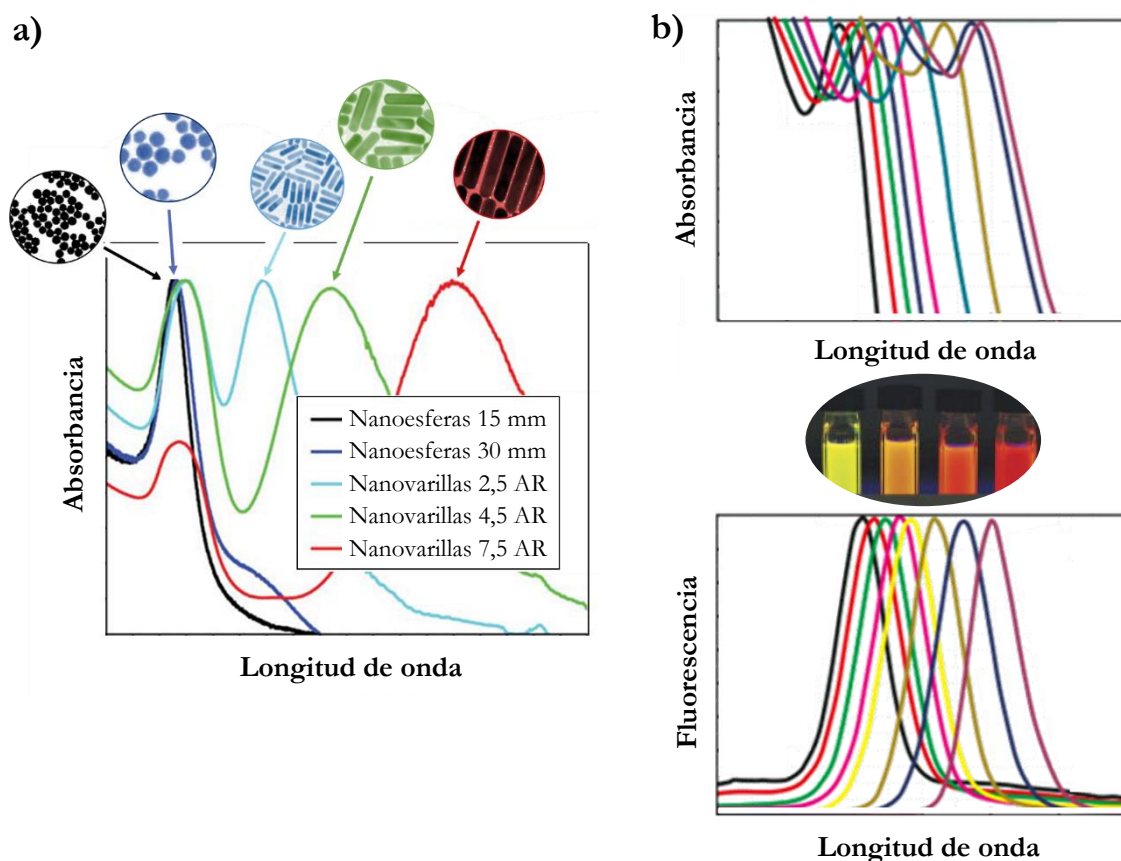


Figura I.15. (a) AuNPs de forma esférica y en forma de varilla con diferentes tamaños y relación dimensional (AR, aspect ratio), respectivamente. (b) Perfiles de absorción y emisión de QDs de CdSe con tamaño de partícula de entre 2 (perfil de la izquierda) y 5 nm (perfil de la derecha).

Asimismo, la espectroscopía de fotoluminiscencia (PL) es comúnmente utilizada para evaluar la calidad de los NMs fluorescentes, entre los que se incluyen los materiales semiconductores. La dinámica y la forma de la línea espectral de fluorescencia están determinadas tanto por el band gap del material, la estequiometría, el tamaño de los nanocristales y los defectos.⁷¹ Como se puede observar en la **Figura I.15b**, correspondiente a QDs, un aumento del tamaño de partícula implica un desplazamiento batocrómico gradual de los máximos de absorción y emisión, como se explicó anteriormente. Además, visualmente se puede distinguir entre los diferentes tamaños de partícula en función del color en el que emitan, desde la región ultravioleta hasta el infrarrojo cercano.⁷² No obstante, este hecho no ocurre de forma generalizada para todos los NMs con propiedades fluorescentes.

Por su parte, la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR, Fourier-transform infrared spectroscopy) utiliza luz infrarroja para escanear las

muestras permitiendo identificar la presencia de ciertos grupos funcionales en la superficie de los NMs. La radiación absorbida por la muestra es posteriormente convertida en energía vibracional o rotacional. La señal resultante obtenida en el detector es un espectro generalmente de entre 4000 y 400 cm^{-1} que representa la huella molecular de la muestra. Cada molécula presenta una huella digital característica y única, lo que hace de la FT-IR una herramienta valiosa para la identificación química.⁴⁸ La espectroscopía Raman proporciona una información similar, pero complementaria.

En el caso de las NPs magnéticas es necesario estudiar su respuesta a los campos magnéticos. La magnetometría SQUID (de sus siglas en inglés, Superconducting Quantum Interference Device) es la técnica habitualmente empleada para la obtención de curvas de imanación y para el estudio de la dependencia térmica.⁷³

Además de las técnicas anteriormente mencionadas, para su caracterización también se han empleado métodos electroquímicos de análisis de NMs,^{74,75} como la voltamperometría.⁷⁶ Asimismo, el análisis termogravimétrico (TGA) es un método de análisis térmico en el cual se evalúa la pérdida de masa de una muestra a lo largo del tiempo en función de la temperatura. Esta técnica se ha utilizado como un método de caracterización, por ejemplo, para determinar la calidad de los CNTs⁷⁷ e incluso después de procesos de oxidación.⁷⁸

Con el fin de obtener información tanto del tamaño como de la composición química de los materiales, existe una tendencia al alza a combinar técnicas microscópicas y espectroscópicas. Algunos ejemplos son AFM-Raman,⁷⁹ AFM-ATR-IR⁸⁰ o AFM-SECM (microscopía electroquímica de barrido).⁸¹ Las técnicas combinadas también pueden ser de gran utilidad en el estudio de materiales a escala nanométrica.^{82,83}

Finalmente, en la **Tabla I.1.** se relacionan las principales características a estudiar de las nanoestructuras con las técnicas que brindan dicha información.

Tabla I.1. Principales técnicas para la caracterización fisicoquímica de las nanoestructuras y los principales parámetros obtenidos por cada técnica.

Técnicas de caracterización	Información aportada
<u>Microscópicas</u>	
(HR)TEM, (HR)SEM, STEM, cryo-EM	Morfología, homogeneidad, cristalinidad
AFM	Morfología, homogeneidad, grado de cobertura de la superficie
<u>Espectroscópicas</u>	
UV-Vis	Tamaño, concentración, alteraciones en el entorno
PL	Tamaño, distribución de tamaños, alteraciones ambientales, eficiencia cuántica, defectos superficiales
DLS	Distribución de tamaños, homogeneidad, revestimiento de la superficie
ELS	Potencial Z, homogeneidad, alteraciones en el entorno
Raman	Composición química y estructural
FT-IR	Composición química y estructural
XRD	Estructura cristalina, parámetros de red, pureza
EDS	Análisis de composición elemental
NMR	Determinación estructural
<u>Electroquímicas</u>	
CV	Procesos de oxidación y reducción
<u>Termogravimétricas</u>	
TGA	Composición química y estructural
DSC	Pureza cristalina
<u>Separación</u>	
CE (CZE, MEKC, CGE)	Tamaño, homogeneidad, cobertura superficial, carga superficial, alteraciones en el entorno
SEC	Tamaño, homogeneidad
AF4-spICP-MS/PL/MALS	Distribución de tamaños, análisis de composición

AF4: Fraccionamiento de flujo de campo-flujo asimétrico; **AFM:** Microscopía de fuerza atómica; **CGE:** Electroforesis capilar en gel; **CV:** Voltametría cíclica; **CZE:** Electroforesis capilar en zona; **DLS:** Dispersión dinámica de la luz; **DSC:** Calorimetría diferencial de barrido; **EDS:** Energía dispersiva de rayos X; **ELS:** Dispersión de luz electroforética; **FT-IR:** Infrarrojo por transformada de Fourier; **MALS:** Dispersión de luz multiángulo; **MEKC:** Cromatografía electrocinética micelar; **MS:** Espectrometría de masas; **NMR:** Resonancia magnética nuclear; **PL:** Fotoluminiscencia; **SEC:** Cromatografía de exclusión por tamaños; **SEM:** Microscopía electrónica de barrido; **spICP:** Plasma acoplado inductivamente de una partícula; **STEM:** Microscopía electrónica de transmisión de barrido; **TEM:** Microscopía electrónica de transmisión; **TGA:** Análisis termogravimétrico; **UV-Vis:** Ultravioleta-visible; **XRD:** Difracción de rayos X.

I.1.5. Toxicidad asociada al uso de nanomateriales

El crecimiento progresivo de la Nanotecnología es un hecho tan prometedor como controvertido ya que plantea riesgos desconocidos que pueden estar asociados a la manipulación de los NMs. Por ello, surge la necesidad de realizar una evaluación exhaustiva sobre el impacto negativo que pudiesen presentar, a corto o largo plazo, aquellas aplicaciones que supongan una interacción directa o indirecta con los seres vivos o el medioambiente.

La exposición primaria a los NMs puede ocurrir por diferentes vías, ya sea mediante inhalación, vía dérmica o ingesta.⁸⁴ Asimismo, en las últimas décadas, debido al aumento de las aplicaciones en el ámbito de la biomedicina,^{85, 86} la exposición por vía parenteral ha aumentado extensamente. Los escenarios más comunes para dicha exposición son el entorno laboral y el uso de productos de consumo a los que hayan migrado descontroladamente los NMs, aunque la exposición ambiental también es posible tras un vertido o derrame o incluso una interacción indirecta a través de la cadena alimentaria al ingerir organismos previamente expuestos a estas estructuras nanométricas.⁸⁷⁻⁸⁹

En los últimos años, se han publicado varios artículos relacionados con la evaluación de la toxicidad de diferentes NPs y sus estudios epidemiológicos asociados.⁹⁰⁻⁹³ A partir de estos y muchos otros estudios, se puede deducir que las NPs son capaces de penetrar en el organismo e interactuar con tejidos, células o estructuras biomoleculares presentes en los órganos de exposición primaria y permanecer durante largos periodos de tiempo. Además, algunas NPs serían capaces de atravesar las barreras biológicas manteniendo su propia identidad y migrar a diferentes zonas del organismo, a través del sistema circulatorio o el nervioso, alcanzando órganos alejados de la vía de exposición primaria y a los que cuales no tendrían acceso partículas de mayor tamaño.⁹⁴

Cada vez hay más evidencias de que algunos NMs pueden ser más tóxicos en comparación con la misma masa de partículas de composición similar pero de mayor tamaño.⁹⁵ A pesar de que los mecanismos de toxicidad no están bien definidos, los principales están asociados con la inducción de estrés oxidativo, produciendo efectos

adversos como la inflamación de tejidos o genotoxicidad, los cuales podrían llegar a desembocar en distintos trastornos y enfermedades.^{96, 97} Por ejemplo, el TiO₂ se considera biológicamente inerte en su forma macroscópica y es ampliamente utilizado como aditivo alimentario siendo generalmente reconocido como seguro (GRAS, Generally Regarded as Safe) por la Administración de alimentos y medicamentos (FDA, Food and Drug Administration). Sin embargo, experimentos *in vitro* muestran que en su forma nanoestructurada en ocasiones produce daños en el ADN, interrumpe la función de las células y puede provocar inflamación.⁸⁴

Este hecho se puede explicar en base a que características como la capacidad para atravesar las barreras biológicas de las células o la permanencia de estos materiales nanoestructurados en el interior del organismo dependen en gran medida de su tamaño. Por otro lado, un aumento del número de átomos superficiales, con respecto a los más inaccesibles, en una estructura nanométrica puede producir un aumento de su toxicidad intrínseca en comparación con la exposición a dosis similares del mismo material a escala macroscópica debido a la mayor reactividad.⁹⁴

No obstante, esta dependencia del tamaño de partícula sobre las respuestas biológicas no implica que todas ellas necesariamente sean tóxicas, ya que la toxicidad puede estar también influenciada por otros parámetros fisicoquímicos característicos como su forma, composición química y características superficiales, carga superficial, solubilidad, estado de agregación o reactividad, entre otras.⁸⁴

Aunque hay poca evidencia contrastada, es probable que, como se mencionó anteriormente, la forma de las NPs influya en su toxicidad. Porter y col. llevaron a cabo un estudio en animales para evaluar los efectos que les produce la inhalación de TiO₂NPs de diferentes formas,⁹⁸ concretamente de forma esférica y en forma fibrilar, éstas últimas a su vez de dos longitudes diferentes. Este ensayo reveló que las nanoesferas alteraban las respuestas pulmonares en menor medida que lo hacían aquellas de forma tubular o fibrilar y, a su vez, en el caso de las estructuras en forma de fibras, dicha alteración parece también aumentar cuando se incrementa la relación longitud/diámetro.

Otros factores decisivos en la toxicidad de determinadas NPs son también su composición y su estructura cristalina. Continuando con este tipo de NPs, se ha observado que las basadas en TiO_2 resultan ser menos tóxicas en forma de rutilo que en forma de anatasa mostrando un elevado poder para inducir inflamación tisular cuando son inhaladas.⁹⁹ Otros estudios relevaron que las NPs en forma de anatasa además ejercían una mayor citotoxicidad en las células bronquiales en comparación con las de forma de rutilo. No obstante, y en contraposición se observó un mayor nivel de genotoxicidad en las células alveolares y bronquiales tratadas con rutilo en comparación con anatasa.¹⁰⁰ Además, las TiO_2 NPs en función de su estructura cristalina presentan diferente reactividad. Mientras que en forma de anatasa son conocidas por su potencial actividad fotocatalítica,¹⁰¹ en forma de rutilo son fotoestables, es decir, estas NPs se usan para proteger un sistema de la fotodegradación.¹⁰²

Por otra parte, las química superficial de las NPs sintéticas condicionará factores como su solubilidad, estado de agregación, reactividad e incluso su toxicidad⁸⁴ al modificarse ciertas propiedades fisicoquímicas pudiendo llegar a alterar las células. La superficie del NM podría modificarse o funcionalizarse con múltiples recubrimientos de naturaleza orgánica e inorgánica. Estas modificaciones generalmente se realizan por las siguientes razones: para pasivar la superficie de las nanoestructuras, controlar su tamaño, hacer que sean dispersables en un solvente o formulación en particular y, en algunos casos, para mejorar la especificidad. Los efectos adversos de las NPs pueden mitigarse o eliminarse mediante la incorporación de recubrimientos superficiales. No obstante, el tipo de superficie en el recubrimiento secundario también puede alterar la toxicidad. A modo de ejemplo, se puede reducir la genotoxicidad de materiales cuya naturaleza es altamente tóxica como son los QDs, que generalmente están compuestos por metales pesados como el cadmio, recubriendo su superficie por metales no pesados, impidiendo así que los metales tóxicos interaccionen con las proteínas o el ADN.¹⁰³

La carga superficial también está vinculada a la toxicidad, ya que puede influir en la adsorción de iones y biomoléculas que pueden modificar las respuestas celulares y del organismo hacia las partículas. Además, la carga superficial es determinante en

el comportamiento coloidal, influyendo en la respuesta del organismo al modificar la morfología de las NPs a través de la formación de agregados o aglomerados.¹⁰⁴ La agregación condiciona el destino y la toxicidad de las nanoestructuras en el medioambiente. Por lo tanto, una dispersión coloidal adecuada y estable de las NPs en el medio de suministro es muy importante para su distribución biológica y su actividad posterior.¹⁰⁵ En general, se cree que las superficies catiónicas son más tóxicas que las neutras o aniónicas, ya que es más probable que las superficies catiónicas induzcan hemólisis y agregación plaquetaria, mientras que las superficies sin carga o aniónicas son las más biocompatibles. Esto puede deberse a la afinidad de las partículas catiónicas por las membranas celulares, cargadas negativamente, facilitando su interacción.^{106, 107}

Con relación a lo anterior, el efecto de la hidrofobicidad de la superficie sobre la toxicidad también ha sido investigada. Concretamente, en un estudio llevado a cabo por Chompoosor y col.¹⁰⁸ se observó que el aumento de la hidrofobicidad en la superficie de las NPs, en este caso de oro unidas a una cadena alquílica hidrofóbica variada, resultó en una mayor citotoxicidad con la producción concomitante de especies reactivas de oxígeno. Esto es debido a que las NPs menos solubles en medios biológicos podrían acumularse en el organismo y persistir durante largos periodos de tiempo, favoreciendo así la exposición prolongada a fenómenos de citotoxicidad.

A modo de resumen, en la **Tabla I.2** y la **Figura I.16** se muestran las principales características fisicoquímicas vinculadas a la posible toxicidad intrínseca de los NMs.

Tabla I.2. Diferentes factores físicos y químicos de los NMs relacionados con su posible toxicidad.

Factor físico	Relación con la toxicidad
Tamaño y área superficial específica	A medida que disminuye el tamaño de partícula, el área superficial se ve ampliamente incrementado y, con ello, el número de átomos en la superficie, lo que conduce a una mayor reactividad de la partícula.
Forma	Se asume que los NMs con formas tubulares o fibrosas parecen ser más tóxicos que los que presentan forma irregular y estos, a su vez, más que aquellos con forma esférica.
Estado de agregación	Si las partículas se agregan o aglomeran, creando así estructuras compactas de mayor tamaño, puede variar el lugar de depósito o acumulación, así como su toxicidad.
Cristalinidad	Las diferentes estructuras cristalinas de los NMs pueden tener diferentes comportamientos toxicológicos.
Factor químico	Relación con la toxicidad
Composición química	Una mayor toxicidad de un material a escala no nanoscópica, generalmente también implicará una mayor toxicidad de su homólogo a escala nanométrica. Además, posibles adherencias a la superficie de la nanoestructura, tales como impurezas del proceso de síntesis, también afectarán a su toxicidad.
Solubilidad	En función de la composición química, algunas partículas presentarán mayor solubilidad en medios acuosos, como es el medio biológico, que otras. Al disolverse podrán ser más fácilmente eliminadas del organismo e incluso en ocasiones perderán su estructura nanométrica y, por consiguiente, la posible toxicidad asociada a dicho tamaño, siguiendo entonces las consideraciones toxicológicas similares a las de cualquier otro contaminante con efectos sistémicos. De lo contrario, las NPs poco solubles o insolubles en medios acuosos tenderán a la acumulación y mantendrán la posible toxicidad asociada a la forma nanométrica. Esta es la razón por la cual las NPs que generan una mayor preocupación son aquellas que poseen una menor solubilidad acuosa.

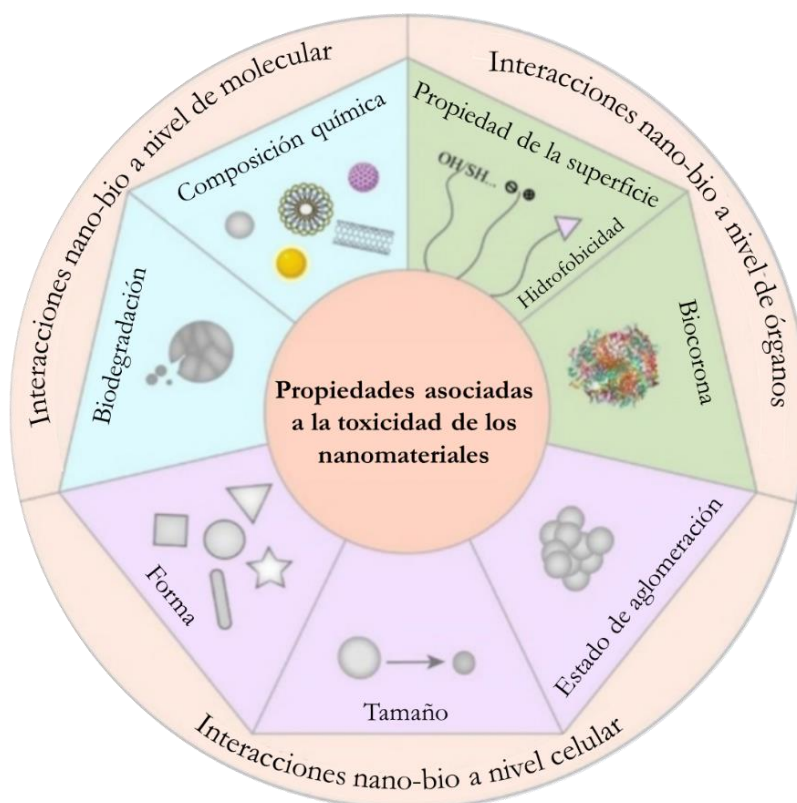


Figura I.16. Ilustración de las posibles interacciones nano-bio influenciadas por las diferentes propiedades características de los NMs. Figura adaptada de [109]. Copyright © 2022, Elsevier.

Por consiguiente, es de gran importancia llevar a cabo un control exhaustivo de la presencia de los materiales a escala nanométrica en las diferentes matrices, así como, una rigurosa evaluación de las propiedades físicoquímicas de los mismos y su interacción con el entorno en el que se encuentren para poder caracterizar su potencial toxicológico,¹¹⁰ resultando muy relevante la participación de la Química Analítica en este sentido. Además, el riesgo estará asociado a otros factores que no dependen propiamente de las NPs, como la vía y/o nivel de exposición al agente tóxico, siendo mayor para exposiciones durante periodos de tiempo prolongados y para aquellas que son inhaladas, o la genética de los individuos expuestos a ellas la cual proporcionará las herramientas bioquímicas necesarias para combatir su toxicidad en caso de que presentase.

I.2. Perspectivas de la Nanociencia y Nanotecnología Analítica según la participación de los nanomateriales

Hasta la fecha, dentro de la AN&N se pueden diferenciar tres perspectivas o vías en función de cual sea la participación de los NMs en el proceso analítico. Una de ellas está centrada en el empleo de NMs como herramientas para la mejora de metodologías analíticas, aprovechando sus excelentes propiedades físicas y químicas. Otra perspectiva se basa en la caracterización, detección y cuantificación de NMs, es decir, en este caso los NMs son el principal objeto de estudio en la investigación. Las dos perspectivas hasta ahora mencionadas son las conocidas como facetas clásicas de la AN&N, sin embargo, en los últimos años se ha intentado ir más allá con el fin de profundizar y dar un paso más en esta disciplina metrológica. El grupo de investigadores liderado por el Prof. Valcárcel observó que el empleo de nanoherramientas para el estudio de otras estructuras de su mismo tamaño incrementa la capacidad de extraer información del mundo minúsculo. Fruto de su experiencia y del estudio realizado en muestras ambientales, agroalimentarias y clínicas, propusieron como novedad una tercera vertiente consistente en una sinergia entre las dos anteriores, esto es, el empleo de NMs tanto como analitos como herramientas de análisis, ambas dentro de un mismo proceso analítico. Esta nueva vertiente fue denominada *tercera vía* de la AN&N.¹¹¹ Cabe destacar que las dos últimas vías mencionadas anteriormente han dado lugar a un nuevo ámbito de estudio de la Química Analítica centrado en el análisis del nanomundo,¹¹² el cual se describirá más adelante.

I.2.1. Nanomateriales como herramientas analíticas

Sin duda alguna, el principal objetivo de todo proceso químico de medida es la obtención de información de calidad mediante un conjunto de operaciones sucesivas con el fin de dar solución a un determinado problema científico-técnico o socio-económico. Para dicho fin, se requiere una metodología sistemática y concreta que, en el área de la Química Analítica, recibe el nombre de proceso analítico. Son diferentes etapas las que componen dicho proceso, entre las que se incluyen: la toma de muestra o muestreo, preparación de la muestra, adquisición y transducción de la

señal analítica (a menudo implica la separación y detección) y tratamiento de datos para ofrecer los resultados.¹¹³ Es muy importante tener en cuenta que dichas etapas son consecutivas y dependientes entre sí, por lo que es necesario tener especial cuidado en cada una de ellas ya que de lo contrario se podrían ocasionar y arrastrar errores que darían lugar a resultados erróneos y poco reproducibles.

En este ámbito, la AN&N ha impulsado el uso de NMs como herramienta analítica con la intención de mejorar procesos analíticos ya descritos o desarrollar otros innovadores aplicables a nuevos analitos o matrices. Como se esquematiza en la **Figura I.17**, los NMs pueden ser empleados en las diferentes etapas del proceso analítico. El objetivo de la incorporación de los NMs en alguna de sus etapas es el de explotar las propiedades fisicoquímicas únicas de la materia a escala nanométrica, mejorando así las características de funcionamiento analítico de una determinada metodología, que son indicadores de la calidad de la información proporcionada. Asimismo, las nanoherramientas son capaces de brindar información sobre una amplia variedad de objetos o sistemas, la cual no podría ser obtenida a través de sistemas clásicos, respaldando el desarrollo en una variedad de áreas.¹¹⁴⁻¹¹⁶ La función y la propiedad explotada del NM varían en función de la etapa en la cual esté implicado incluso, a veces, se puede llegar a sacar provecho a más de una de sus propiedades, ya sean químicas, ópticas, eléctricas, térmicas o magnéticas (**Figura I.12**). Los NMs se pueden emplear tal cual se obtienen tras el proceso de síntesis, bien en disolución o incorporados en un soporte inerte, así como, funcionalizados con diferentes componentes ya sean inorgánicos, orgánicos o biológicos e incluso como nanoestructuras híbridas para potenciar aún más sus excelentes propiedades. Todo ello dependerá de la aplicación para la cual esté destinado.

Generalmente, la miniaturización de los sistemas analíticos, en cualquiera de las etapas del proceso analítico, viene acompañada de importantes ventajas con respecto a los procedimientos tradicionales. Algunas de estas ventajas incluyen beneficios nivel económico, mayores recuperaciones de extracción gracias al incremento del área superficial en contacto con la muestra, aumento de la sensibilidad, selectividad, precisión, tiempos de análisis más reducidos, simplicidad o portabilidad de los sistemas. En definitiva, la economía, el rendimiento analítico mejorado y la

disminución del tamaño de los sistemas analíticos son las principales impulsoras de la miniaturización.

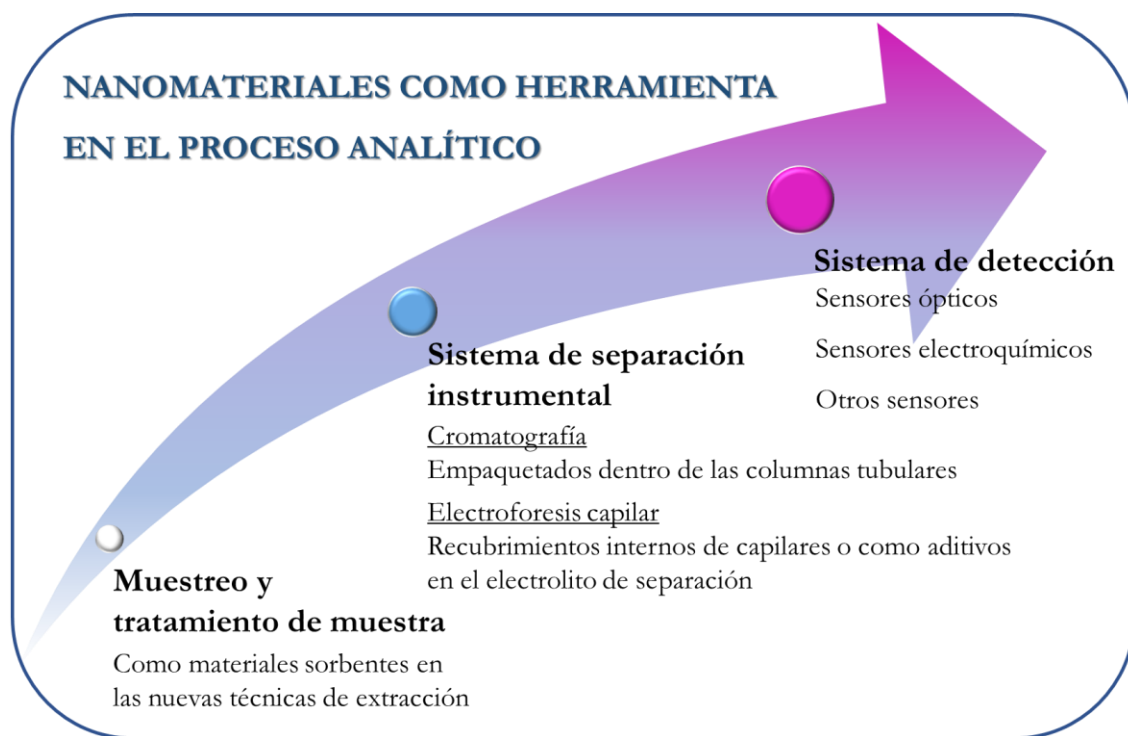


Figura I.17. Incorporación de los NMs como herramienta de análisis en las diferentes etapas del proceso analítico.

En primer lugar, la incorporación de los NMs en la etapa de preparación de la muestra, incluyendo las operaciones de extracción, preconcentración y limpieza, ha permitido mejorar en gran medida las propiedades básicas de una metodología analítica como son la sensibilidad y selectividad en comparación con los materiales no nanoestructurados convencionales, además de simplificarla y reducir su tiempo de preparación. Por otro lado, y en caso de que fuese necesaria la separación instrumental, cada vez son más utilizados los NMs como fases (pseudo)estacionarias en cromatografía líquida (LC) y de gases (GC) o en electroforesis capilar (CE), mejorando considerablemente el rendimiento de la separación en relación con la resolución y, con ello, la selectividad e incluso la sensibilidad del método. Finalmente, en la etapa de detección los NMs se han empleado como sensores ópticos, reemplazando a los fluoróforos convencionales empleados en las técnicas de detección óptica o como sensores electroquímicos por la mejora de la conductividad

y fenómenos de electrocatálisis. Además, éstos logran estabilizar diferentes moléculas aumentando así las superficies activas facilitando la transferencia electrónica.

A modo de ejemplo, los CNTs son NMs ampliamente utilizados en los procesos analíticos como alternativa a los materiales convencionales con el objetivo de mejorar la calidad tanto del proceso como de los resultados. Algunas de sus aplicaciones incluyen, adsorbentes en extracción en fase sólida (SPE, Solid-Phase Extraction),¹¹⁷ soportes inertes o activos (por ejemplo, inmunosensores),¹¹⁸ anfitriones en interacciones supramoleculares¹¹⁹ y sensores si participan en el proceso de detección.^{120, 121} Así pues, en este último caso los "nanotubos" son un tipo de "nanosensores", cuando el NM está directamente involucrado en la etapa de detección. Por otro lado, los NMs basados en carbono con propiedades luminiscentes, como los nanopuntos de carbono (CNDs o CDs), puntos cuánticos de carbono (CQDs), puntos cuánticos de grafeno (GQDs) o el óxido de grafeno (GO), son tremendamente prometedores ya que debido a su estructura permiten las interacciones π - π y, como consecuencia, tanto sus propiedades ópticas como su capacidad de adsorción pueden ser explotadas como se comentará más adelante. Así, las principales ventajas del uso de los NMs como herramientas en las distintas etapas del proceso analítico no solo pueden ser aprovechadas desde el punto de vista de la determinación de analitos comunes sino también de otros NMs.

Con el objetivo de desarrollar nuevas metodologías analíticas que impliquen el uso de NMs como herramientas y beneficiarnos así de sus propiedades tanto físicas como químicas, se han sintetizado NPs metálicas, concretamente de oro de diferentes tamaños, y basadas en carbono con distinta funcionalización. El desarrollo de estos procedimientos analíticos se abordará a lo largo de los Capítulos III y IV.

I.2.1.1. Nanomateriales implicados en el tratamiento o preparación de la muestra

El análisis de una muestra sin la necesidad de un tratamiento previo de la misma sería lo ideal, sin embargo, la preparación de la muestra es en muchos casos inevitable. Además, esta etapa es una de las más críticas jugando un papel esencial en

la sensibilidad y selectividad de la metodología a desarrollar, llegando a ocupar en torno a un 60% del tiempo total necesario para completar el proceso analítico.¹²²

Esta etapa consiste en la realización de una serie de operaciones necesarias para convertir la muestra en la forma adecuada y compatible para el análisis, comprendiendo todas las transformaciones desde que se obtiene la muestra original hasta llegar a la etapa de medida de el/los analito/s de interés. La importancia de las operaciones que engloban esta etapa es frecuentemente subestimada a pesar de que es en ellas donde se cometen los mayores errores. Diferentes factores afectan a la etapa de preparación de la muestra (extracción o limpieza y preconcentración) como son la naturaleza y concentración del analito, la complejidad de la matriz en la que se encuentre y la técnica instrumental a utilizar para llevar a cabo el análisis. El tratamiento de muestra es necesario para preconcentrar o diluir analitos en muestras en las que estén presentes en concentraciones inferiores al límite de detección de la técnica o fuera de la curva de calibrado, lograr una limpieza de la muestra y así eliminar las interferencias que puedan existir por parte de la matriz o, incluso, realizar reacciones de derivatización para conseguir compatibilidad con la técnica analítica a utilizar.

Existe una amplia gama de procedimientos disponibles para el tratamiento de muestra, tales como la SPE y la extracción líquido-líquido (LLE, Liquid-Liquid Extraction), extracción con solvente convencional, extracción con solvente presurizado, extracción con Soxhlet, extracción con fluidos supercríticos, la extracción asistida por microondas y ultrasonidos o la filtración. De todas ellas, las dos primeras son las técnicas clásicas más utilizadas para el enriquecimiento de los analitos y la eliminación de interferentes o limpieza de las muestras. Se puede utilizar una gran variedad de fases de extracción como, por ejemplo, adsorbentes poliméricos, disolventes orgánicos, líquidos iónicos o dióxido de carbono, en función de la técnica de preparación de la muestra.¹²³

Sin embargo, la utilización de este tipo de técnicas presenta una serie de limitaciones como son el tiempo necesario para acondicionar la muestra, el coste y que tampoco contribuyen a ser estrechamente respetuosas con el medioambiente.

Como se ha comentado previamente, la etapa de la preparación de la muestra dentro del proceso analítico también ha sido beneficiaria del uso de NMs, cuya efectividad ha sido ampliamente demostrada. Además de los desafíos analíticos anteriormente mencionados que se logran tras la miniaturización, generalmente, su incorporación ofrece importantes ventajas operacionales, en términos de tiempo, complejidad y costes e incluso reducción en el consumo de muestra y reactivos y de los residuos generados frente a otras modalidades utilizadas tradicionalmente.^{123, 124} De acuerdo con su función en la etapa del tratamiento de muestra, los NMs pueden actuar como:³⁷

- a) Agente adsorbente, donde tiene lugar la interacción analito-nanoestructura.
- b) Soporte inerte, como las NPs de sílice funcionalizadas con un agente complejante.
- c) Agente de ionización, para el análisis directo de muestras por espectrometría de masas de iones secundarios.
- d) Materiales magnéticos, una propiedad especial que facilita el aislamiento del analito, así mediante el uso de un campo magnético se puede simplificar el procedimiento analítico.

Estas funciones pueden ser combinadas siendo la primera de ellas es la más común. Esto es debido a la elevada relación superficie-volumen que presentan los materiales nanoestructurados, la cual les confiere una alta capacidad de adsorción en comparación con los materiales utilizados tradicionalmente en las técnicas de extracción, mejorando así su eficacia. Como consecuencia, la cantidad de adsorbente a utilizar para una determinada aplicación es muy inferior en comparación con el uso de materiales adsorbentes convencionales. Otra característica por destacar es la posibilidad de modificar químicamente y a conveniencia los NMs para favorecer una adsorción selectiva hacia un determinado compuesto.¹²⁴⁻¹²⁶ Además, las propiedades térmicas, mecánicas y electrónicas únicas que presentan los NMs les hacen ser idóneos para su uso en esta etapa del proceso.

Debido a todas las ventajas señaladas, existen varios tipos de NMs con potencial analítico en su uso como agentes adsorbentes, siendo los más destacados

los basados en carbono, los magnéticos y las NFs electrohiladas.¹²⁷ En particular, los NMs de carbono han despertado gran interés gracias a su singular configuración electrónica π , así como, los óxidos metálicos en virtud de su gran área superficial. En este sentido, y a modo de ejemplo, los CNTs han sido ampliamente utilizados como adsorbentes para la SPE o microextracción en fase sólida (SPME),^{117, 128-130} siendo reemplazados cada vez más los materiales convencionales usados para dicho fin. No obstante, los CNTs empaquetados tienden en gran medida a la agregación, por ello, se requiere que se evite esta tendencia y se favorezcan las interacciones entre los analitos y los NMs bien dispersos para su inclusión como una aplicación de la N&N. Otros NMs basados en carbono que son comúnmente utilizados como agentes adsorbentes han sido los fullerenos, mayormente en los procesos de extracción y preconcentración de compuestos orgánicos¹³¹ y de metales a niveles (ultra)traza.¹²⁷ Además, se ha evaluado el potencial de las NPs de carbono con forma cónica, como son los nanoconos/nanodiscos, como material adsorbente en SPE y SPME en la determinación de clorofenoles en muestras de agua de diferente procedencia como problema analítico modelo¹³² y los nanocuernos de pared simple (SWCNHs) para la posterior determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) también en el mismo tipo de muestra.¹³³

Por otro lado, muchas NPs con propiedades magnéticas también han sido ampliamente utilizadas como adsorbentes para la captación de una amplia gama de analitos. Sin embargo, el material que se aplica con mayor frecuencia para recubrir el núcleo de este tipo de nanoestructuras es la sílice al poder presentar diversa funcionalización. Para permitir la extracción selectiva de analitos, el recubrimiento de sílice se puede funcionalizar con organosilanos y/o ligandos de afinidad.¹²⁷ En comparación con la SPE convencional, mediante la extracción en fase sólida magnética (MSPE) el pretratamiento de la muestra se simplifica considerablemente debido a que no es necesario rellenar una columna con el adsorbente, ya que la separación de fases se puede lograr rápida y fácilmente simplemente aplicando un campo magnético externo. Concretamente, la MSPE está basada en la dispersión de un adsorbente sólido con propiedades magnéticas en la muestra que contiene los analitos de interés con objeto de llevar a cabo la extracción, limpieza y

preconcentración de analitos. De esta forma el contacto directo de las NPs con los analitos permite la adsorción selectiva sobre la superficie de la estructura nanométrica. A continuación, el adsorbente con el analito de interés adherido se separa de la disolución mediante la aplicación de un campo magnético externo. Posteriormente, se produce la desorción del analito mediante el uso de un eluyente adecuado. Por último, el extracto resultante se somete a análisis mientras que el adsorbente puede recuperarse para su posterior uso en otro proceso de extracción. Esta técnica es sencilla, limpia y además permite la rápida separación de la mezcla de reacción por la aplicación de un campo magnético externo evitando así etapas más lentas de centrifugación o filtración, minimizando la manipulación de muestra. Además, la ventaja de poder reutilizar el material adsorbente la convierte en una técnica económica, además de respetuosa con el medioambiente. A modo de ejemplo, se han utilizado materiales magnéticos como nanoadsorbentes que contienen un núcleo de maghemita y una capa mesoporosa de sílice para la eliminación simultánea de PAHs y trazas metálicas en aguas residuales de origen industrial.¹³⁴

Finalmente, otro tipo de nanoestructuras comúnmente utilizadas en el tratamiento de muestra son las NFs electrohiladas. Aunque existen otros métodos adecuados para la preparación de NFs como la síntesis de plantillas, el dibujo, la separación de fases y el autoensamblaje, el electrohilado tiene una ventaja sobre todos ellos debido a su capacidad de controlar fácilmente la orientación de las fibras.¹²⁷ Esta técnica es relativamente sencilla y eficiente para la producción de polímeros con estructuras fibrosas a nanoescala, obteniéndose fibras con una elevada superficie específica. Los dispositivos de SPE que emplean NFs electrohiladas como material adsorbente se basan principalmente en polímeros de poliestireno (resistencia mecánica relativamente baja)¹³⁵ o nailon 6 (resistencia mecánica relativamente alta).¹³⁶

I.2.1.2. Nanomateriales implicados en el sistema de separación instrumental

Las técnicas de separación instrumental son comúnmente empleadas en Química Analítica para la separación de compuestos diana previamente al proceso de detección. En las últimas décadas, el proceso de separación ha sido ampliamente enriquecido con el uso de NMs, los cuales suelen ser empleados como fases

(pseudo)estacionarias en cromatografía y electroforesis,¹³⁷ favoreciendo la eficiencia del proceso. En este sentido, los NMs permiten mejorar la resolución en la separación y, en consecuencia, la selectividad de la técnica instrumental. De esta forma, los resultados son claramente más favorables en comparación con los obtenidos empleando los materiales tradicionales. Mediante el uso de nanoestructuras, la resolución generalmente suele verse mejorada debido a su elevada capacidad de adsorción, atractiva química superficial e incluso larga vida útil. Además, su gran relación superficie-volumen es ideal para lograr efectos de baja transferencia de masa en cromatografía.¹³⁸ Dadas las excelentes propiedades mencionadas, estos materiales pueden interactuar ya sea con la superficie capilar, el analito o ambos, produciendo variaciones en los coeficientes de separación, mejorando así la precisión del análisis y aumentando la eficiencia de separación.^{139, 140}

Los últimos avances reflejan una extensa utilización de los NMs en cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), GC, CE, electrocromatografía capilar (CEC), formatos CEC tubulares abiertos y microchip CE, empleando los materiales nanoestructurados como componentes de los medios de separación.^{141, 142}

El uso de materiales de tamaño nanométrico en sistemas de separación electroforéticos ha recibido más atención que en los sistemas de cromatografía de gases y líquidos de flujo laminar (LC y GC).¹³⁷ En CE, la separación es el resultado de la diferente migración de los analitos libres y de aquellos que están interaccionando con la pseudofase cuando se aplica una diferencia de potencial eléctrico. Las NPs pueden actuar como pseudofases formando parte del revestimiento interno del capilar o como aditivo en el electrolito de separación. Se ha empleado una gran variedad de NPs como fases pseudoestacionarias en CE,¹⁴³ como SWCNHs,¹⁴⁴ CNTs,¹⁴⁵ fullerenos,¹⁴⁶ grafeno,¹⁴⁷ sílice,^{148, 149} o de plata y oro.¹⁵⁰ Sin embargo, la principal desventaja asociada al uso de algunos tipos NPs en CE es su baja estabilidad en medios acuosos, como le ocurre a muchos de los materiales basados en carbono, y la limitación en el uso de disolventes orgánicos para remediarlo, lo que hace necesaria la funcionalización superficial de las NPs o la adición de otras especies como surfactantes que faciliten su dispersión. En este sentido y para compensar esta limitación ha surgido la cromatografía electrocinética micelar de NPs dispersas

(MiNDEKC), otra modalidad electroforética que utiliza NPs recubiertas con algún surfactante como aditivo en el tampón electroforético.^{151, 152}

Por otro lado, las propiedades especiales de las NPs también las hacen apropiadas para su uso como fases estacionarias en GC y LC.¹⁴¹ La miniaturización de las técnicas cromatográficas es principalmente procedente de la reducción del tamaño de la columna analítica, el desarrollo de nuevos materiales como fase estacionaria y la mejora posterior en los sistemas de detección.¹²³ El uso de NPs en LC está mucho más restringido que en GC debido a las altas presiones generadas junto con el calentamiento causado por la fricción.¹³⁷ No obstante, este problema se está intentado resolver al utilizar columnas con partículas de tamaño micrométrico en las técnicas de electrocromatografía capilar y LC de ultra-alta presión.¹²³ Algunas investigaciones también se han centrado en el uso de NPs en LC, GC y cromatografía de intercambio iónico (IC), incluso algunas de ellas de composición híbrida para su uso en la separación de compuestos quirales.^{141, 153, 154}

En este sentido, en el desarrollo de la presente Tesis Doctoral, concretamente en el Capítulo III.2, se ha contribuido al uso de NMs en la etapa de separación instrumental, utilizando CE como técnica de análisis, de compuestos con propiedades beneficiosas para la salud en el análisis de diferentes matrices alimentarias.

I.2.1.3. Nanomateriales implicados en el proceso de detección

Actualmente, existe un creciente interés en la detección y cuantificación rápida y fiable de una gran variedad de especies o variables físicas y químicas presentes en el medio que nos rodea, las cuales debido a su importancia en diferentes ámbitos deben ser controladas. Desde la aparición de los primeros sensores, varios autores han intentado dar una definición apropiada de un sensor químico.^{155, 156} En 1991, la IUPAC definió sensor químico como aquel dispositivo capaz de transformar la información química en una señal útil desde el punto de vista analítico.¹⁵⁷ En contraposición, un sensor físico es todo aquel dispositivo que proporciona información sobre una propiedad física del sistema. En este sentido, el empleo de sensores puede ser de gran utilidad para llevar a cabo dicho control, en tiempo real, en una amplia gama de muestras.

En la actualidad, el desarrollo de un material sensible a la presencia de un determinado analito sigue evidenciando deficiencias en selectividad, estabilidad y otros aspectos; por lo tanto, la investigación y el desarrollo de nuevos sensores que satisfagan estas carencias tiene un valor práctico muy importante. En este sentido entra en juego la N&N, gracias a la cual se han utilizado diferentes enfoques para diseñar nanoestructuras con el fin de hacer frente a la aplicación de detección. Debido a su elevada área superficial, reactividad química, actividad catalítica y excelente capacidad de adsorción, los NMs son excelentes candidatos para su uso como (bio)sensores.¹⁵⁸ Además, la posibilidad de modificar su superficie con ligandos específicos aumenta la selectividad y sensibilidad del sensor, e incluso la biocompatibilidad del mismo.

Concretamente, la detección es la etapa del proceso analítico en la que actualmente se han utilizado más extensamente los NMs por su mayor capacidad para reemplazar a los materiales convencionales. Los NMs se pueden utilizar como modificadores de la superficie de transductores o como componentes ópticos o electroactivos ya sea para mejorar la sensibilidad, acelerar los tiempos de respuesta, incrementar la portabilidad, permitir la detección simultánea de analitos o proporcionar respuestas más estables.¹⁵⁹ A continuación, se describen brevemente algunos ejemplos de sensores basados en detección óptica y electroquímica.

- Sensores ópticos

En función de la señal medible obtenida tras el proceso de transducción, se pueden distinguir varios tipos de sensores, entre los cuales se encuentran los ópticos. Los sensores ópticos son aquellos en los que la interacción específica del elemento receptor del sensor con el analito produce un cambio en las propiedades ópticas del sistema, lo cual lleva asociado la producción de una señal fisicoquímica de carácter óptico. Sin embargo, esto no sería posible sin la interacción de un haz de luz con el sistema sensor.

En el caso de las NPs metálicas, el desarrollo de nanosensores ópticos ha sido fomentado por sus excepcionales propiedades derivadas de la resonancia plasmónica. Así, dichos cambios en las propiedades ópticas pueden consistir en alteraciones del

SPR, tales como: i) modificación de su longitud de onda o intensidad (conocida como espectroscopía LSPR);^{160, 161} ii) cambios visibles de color como resultado de la alteración del estado de agregación de las NPs;^{31, 162, 163} iii) aumento de la dispersión inelástica Raman (SERS);¹⁶⁴⁻¹⁶⁷ o iv) aumento de la temperatura de la superficie metálica debido al decaimiento de la energía no radiativa.¹⁶⁸

Igualmente, los NMs que presenten propiedades fluorescentes, como es el caso de los nanopuntos fluorescentes, ya sean los basados en carbono o los semiconductores, entre otros, pueden alterar su fluorescencia nativa en presencia del analito (inactivación o intensificación de la señal fluorescente), lo que permite la detección de compuestos de distinta naturaleza.¹⁶⁹⁻¹⁷² Otro ejemplo son los CNTs, los cuales actúan como fluoróforos en la zona del infrarrojo cercano (NIR) aunque su aplicación práctica como sensores es bastante limitada ya que sus propiedades luminiscentes varían en función de su estabilidad. No obstante, ya han sido desarrollados sensores de glucosa basados en SWCNTs funcionalizados con componentes funcionales.^{173, 174} Asimismo, las AuNPs funcionalizadas con aptámeros han demostrado su efectividad como detectores fluorescentes selectivos de iones mercurio en matrices acuosas.¹⁷⁵

- Sensores electroquímicos

Un sensor electroquímico es aquel capaz de responder a cambios específicos de alguna propiedad eléctrica, como la corriente eléctrica o el potencial, como consecuencia de la presencia de una especie química que interactúa con él. Este tipo de sensores, pueden utilizar los NMs como modificadores la superficie de los transductores o como componentes electroactivos con el fin de mejorar la sensibilidad.^{176, 177} Los NMs pueden actuar como catalizadores de reacciones electroquímicas favoreciendo una catálisis más efectiva y una mayor superficie de interacción efectiva, así como una transferencia de masa mejorada.^{178, 180} Igualmente, permiten modificar los procesos de transferencia electrónica y mejorar la conductividad entre el analito receptor y el electrodo.¹⁸¹

En los últimos años, la investigación en el campo de los sensores electroquímicos ha evolucionado hacia el análisis simultáneo de especies, la

miniaturización de los electrodos basados en nuevos materiales y su funcionalización superficial estratégica. La serigrafía es una técnica moderadamente reproducible utilizada para la preparación de electrodos de carbono serigrafiados de un único uso (SPCEs, screen-printed carbon electrodes). Los SPCEs representan una herramienta de detección versátil debido a su idoneidad para la incorporación en instrumentación portátil.¹⁷⁸ En las últimas décadas, se ha publicado un gran número de artículos en los que se hace uso de NMs para la modificación de la superficie de los SPCEs para el desarrollo de numerosos sensores electroquímicos. A pesar de que la naturaleza de las nanoestructuras a utilizar puede ser muy diversa,¹⁸²⁻¹⁸⁵ los SPCEs modificados con NPs inorgánicas de carácter metálico son actualmente unos de las más explotados en este campo,¹⁸⁶⁻¹⁸⁸ así como otros NMs basados en diferentes formas alotrópicas de carbono, como los CNTs, NFs o el grafeno.^{189, 190}

En definitiva, la miniaturización de la etapa de detección del proceso analítico ofrece grandes beneficios como son: i) consumo de muestra reducido, ii) mejora de la sensibilidad, iii) reducción de la generación de residuos, iv) alta reproducibilidad con volúmenes de muestra muy pequeños, v) análisis de respuesta rápida, vi) reducción del consumo de energía y, por tanto, mayor economía, vii) portabilidad y viii) automatización.¹²³

En la presente Tesis Doctoral, se han utilizado diferentes estructuras nanométricas en la etapa de detección para el desarrollo de diferentes metodologías analíticas de compuestos de carácter alimentario. En todos los casos el sensor propuesto ha sido de carácter óptico. En primer lugar, y empleando GQDs se ha propuesto un procedimiento de análisis fluorescente de curcumina y nanocurcumina en bebidas de té y suplementos dietéticos, también se presenta un segundo sensor basado en la técnica SERS en el que se utilizan AuNPs para la determinación de eritrosina B en cerezas de cóctel. Por último, una metodología de análisis de catequina en muestras de cacao y en diferentes bebidas utilizando como plataforma sensora riboflavina-GO mediante el uso de señales fluorescentes. Todo ello se describe detalladamente en los Capítulos III.1 y IV.1-2 de la presente Memoria.

I.2.2. Nanomateriales como analitos

Durante las últimas décadas, y sin ser conscientes de ello, el uso de los NMs se está incrementando exponencialmente, dando como resultado la introducción de nanoproductos en el ámbito científico e industrial. Este hecho tiene y tendrá una gran influencia en la tecnología y en la calidad de vida de las personas. Sin embargo, el incremento de uso está creando serias preocupaciones por la seguridad de su aplicación en productos de consumo y relacionados, siendo los NMs diseñados por ingeniería cada vez más utilizados en diferentes industrias, entre las que se encuentra la agroalimentaria. Por otro lado, se espera que los NMs tengan una mayor reactividad con los sistemas biológicos debido a sus propiedades fisicoquímicas. Inevitablemente, este hecho puede venir acompañado de la acumulación de NPs y/o materiales nanoestructurados en el medioambiente.

En consecuencia, es preciso llevar a cabo estudios científicos en profundidad para conocer información acerca de sus características y propiedades a fin de poder descartar posibles riesgos que puedan ocasionar daños en la salud de los seres vivos y su entorno e incluso para poder establecer reglas claras para estas nuevas especies químicas. Asimismo, los NMs en el medioambiente o en los sistemas biológicos pueden sufrir transformaciones, siendo necesario determinar no sólo el material nanoestructurado en su forma primaria, sino también los productos derivados. Uno de los retos actuales de la Química Analítica es considerar los NMs como un nuevo tipo de analitos. Para obtener una información rigurosa de sus propiedades físicas (tamaño, forma o agregación), químicas (número y concentración en masa, y composición), biológicas inherentes (reactividad o toxicidad)¹⁰ y su control analítico en una amplia variedad de matrices complejas, es necesaria la adaptación de técnicas y métodos existentes o el desarrollo de otros nuevos. Por esta razón y sin duda alguna, los enfoques de caracterización, determinación y cuantificación juegan un papel importante para el estudio de NMs, debiendo ser esenciales este tipo de análisis y de carácter obligatorio.

Desde un punto de vista analítico, hasta la aparición de la N&N, la disciplina encargada de estudiar las mediciones y sus aplicaciones, apoyándose en los principios

de trazabilidad-incertidumbre para proporcionar información fiable, ha sido la metrología. Sin embargo, aunque hasta el momento sus principios han sido únicos, el espectacular desarrollo de los NMs y el inmenso interés hacia la Nanotecnología desde variados campos de la actividad científica e industrial, ha provocado que la metrología que se conocía hasta entonces haya tenido que adaptarse a las particularidades a nivel de nanoescala, adecuándose así a la nueva situación planteada. Este hecho ha dado lugar a un nuevo subcampo dentro de la metrología clásica conocida como *nanometrología* o metrología analítica para NMs (AMNM), término recientemente introducido por el Prof. Ríos y col.¹¹² Por tanto, la *nanometrología* analítica es una disciplina científica implicada en disponer de las herramientas analíticas apropiadas para poder realizar medidas sobre el nanomundo, a través de métodos analíticos validados que proporcionen información contrastada y veraz para los usuarios finales (**Figura I.18**). La AMNM también debería de participar en los programas de garantía de calidad debido a la conexión directa entre la metrología y la calidad.

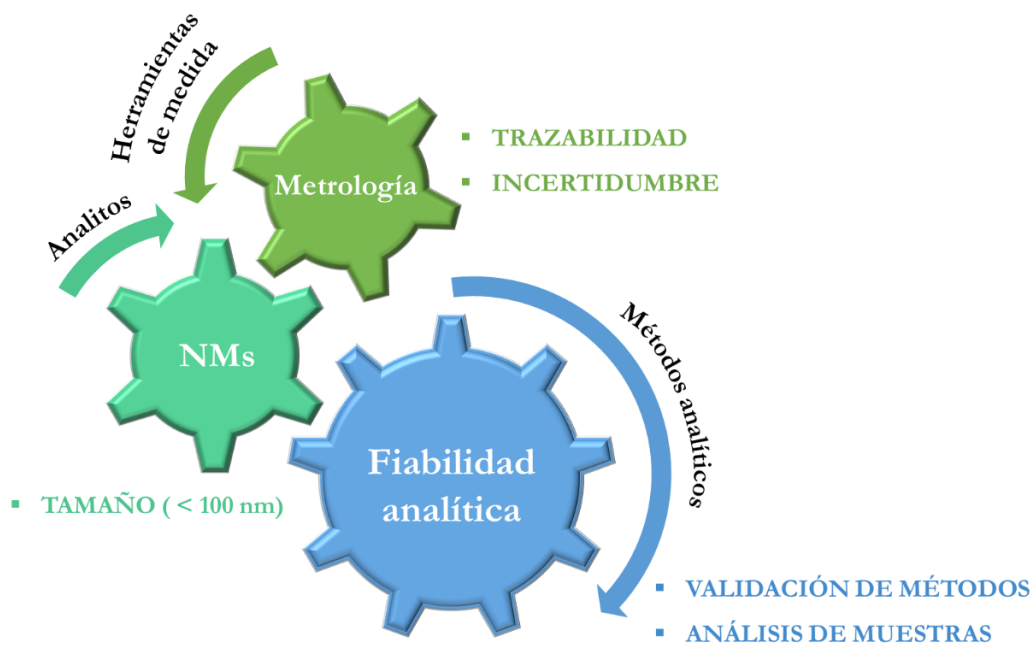


Figura I.18. Principios de la nanometrología analítica.

Aunque lejos de ser suficiente, cada vez es común encontrar investigaciones que se centren en el estudio de materiales a escala nanométrica, ya sea para su caracterización cuando los NMs son simples componentes de la muestra para su posterior utilización como potenciales herramientas de análisis o para su

determinación y cuantificación cuando son el propio analito objeto de estudio. El uso masivo e intencionado de estructuras de tamaño nanométrico en ámbitos como el farmacéutico, alimentario, agroquímico y cosmético, entre muchos otros, implica que la síntesis y producción de NMs deben estar sujetas a estrictos procedimientos de control de calidad para garantizar la reproducibilidad entre el mismo y diferentes lotes. Para ello es necesario disponer de técnicas y métodos de caracterización y determinación seguros y compatibles con las muestras para poder obtener una información rigurosa sobre ellas, que además sean lo suficientemente sensibles como para detectarlas a nivel de traza y capaces de evitar las posibles interferencias por parte de otros NMs o compuestos presentes en la matriz. Asimismo, en el ámbito ambiental, las diferentes esferas o subsistemas de la Tierra (atmósfera, hidrosfera, litosfera y biosfera) siempre han estado en contacto con NPs como resultado de procesos biológicos, químicos, fotoquímicos, mecánicos y térmicos. Estas NPs también incluyen aquellas formadas inintencionadamente como resultado de la actividad humana como la minería, los procesos industriales y la generación de aguas residuales y otros desechos.^{191, 192} Se ha de recalcar la crucial importancia del desarrollo de métodos analíticos que permitan la determinación de nanoestructuras como por ejemplo las basadas en carbono, como el GO reducido (r-GO), los fullerenos o los CNTs, debido a que la exposición a ellos y su uso en productos de consumo se ha visto considerablemente incrementado. La alta tendencia a la agregación de estos materiales en medios acuosos puede dar lugar a su acumulación en el organismo o el entorno, incluso pueden inducir estrés oxidativo celular y, por todo ello, posibles daños en los seres vivos.¹⁹³ Para evitar este hecho, estos NMs pueden ser funcionalizados adecuadamente y correctamente dispersados para evitar su acumulación y, por el contrario, facilitar su excreción.¹⁹⁴⁻¹⁹⁶

En particular, la incorporación de la Nanotecnología en la industria alimentaria presenta numerosas ventajas siendo algunas de ellas, mejoras sensoriales, aumento de la absorción, utilización como agentes bioactivos, estabilización en estructuras alimentarias ante diferentes factores externos, ralentización de la degradación química, entrega dirigida, empaquetamiento e innovación de los productos para aumentar la vida útil, entre muchas otras.^{197, 198} Otra gran parte de este interés se centra en el

diseño de NPs de nueva generación con objeto de proteger, encapsular y liberar componentes bioactivos, para lo cual se deben estudiar y modificar apropiadamente sus propiedades fisicoquímicas (ópticas, reológicas, estabilidad, proceso de liberación, etc.), así como su seguridad, todo ello con el fin de lograr una mayor adecuación y productos finales más eficientes con vistas a diversas aplicaciones comerciales.^{199, 200} Así, los agentes bioactivos de naturaleza hidrófoba presentes en los alimentos funcionales son encapsulados en nanoformulaciones ya sea para superar las limitaciones que presentan o para ser liberados en zonas específicas, constituyendo de este modo los denominados materiales orgánicos nanoestructurados (NOMs) que posteriormente serán incorporados como alimentos nutraceuticos.²⁰¹ La solubilidad, estabilidad, biodisponibilidad, actividad biológica y liberación controlada en tejidos diana son algunas de las propiedades mejoradas de los componentes lipofílicos debido a la nanoencapsulación ya que se consiguen tiempos de residencia más prolongados en el tracto gastrointestinal y, por consiguiente, una absorción más eficiente en el organismo.²⁰²⁻²⁰⁵

En algunos casos, los materiales nanoestructurados tienen una vida corta y se degradan con bastante facilidad, mientras que, en otros casos, los consumidores pueden estar expuestos a ellos de forma continuada. Por ello, además de las muchas ventajas de la nanotecnología en los diferentes ámbitos, no se pueden pasar por alto los posibles riesgos de seguridad asociados a estas especies. Aunque un NM se considere una sustancia GRAS por su composición, se deben adquirir estudios adicionales para examinar el riesgo que pueden inducir las propiedades en los nanoestados las cuales son completamente diferentes de las que se encuentran en los macroestados, así como la interacción del NM con el entorno en el que se encuentre el cual puede verse alterado. Además, el pequeño tamaño de las nanoestructuras puede aumentar el riesgo de deposición en el interior de algunos órganos y tejidos de los organismos vivos.²⁰⁶ En este sentido y desde el punto de vista analítico, se requiere el mayor desarrollo de la nanometrología a fin de obtener más información y control sobre ellos.

Sin embargo, es importante destacar que la gran mayoría de las investigaciones se han centrado en caracterizar y determinar cuantitativamente NMs de naturaleza

inorgánica los cuales, en el ámbito alimentario, generalmente son utilizados como aditivos.^{207, 208} Es por ello, por lo que desarrollar metodologías analíticas que impliquen el estudio de moléculas orgánicas de tamaño nanométrico como analitos se ha convertido en un desafío dentro de esta temática. La **Tabla I.3** resume algunos ejemplos de técnicas y metodologías analíticas para la caracterización, detección y/o cuantificación de NPs de naturaleza inorgánica en diferentes matrices de interés. No obstante, las entidades reguladoras tienen como deber pendiente el desarrollar estándares para los productos comerciales, en caso de ser diseñados para un determinado fin, con objeto de garantizar la calidad y seguridad del producto y las reglamentaciones ambientales.²⁰⁶

Tabla I.3. Selección de algunos ejemplos relevantes que implican la determinación de NPs de naturaleza inorgánica en los ámbitos medioambiental y alimentario.

Tipo de NP (Analito)	Tamaño (nm)	Técnica utilizada	Matriz	Referencia
AgNPs	40	Screening, AF4-ICP-MS	Envases de alimentos	[209]
AgNPs	10 40 60	AF4-ICP-MS	Cerveza	[210]
AgNPs	22	Electroquímica-CV	Agua de mar	[211]
AgNPs	12 – 30	AF4-ICP-MS	Simulantes alimentarios	[212]
AuNPs	6 – 50	MEKC- ICP-MS	Suplementos dietéticos	[213]
AuNPs	31 – 58	UV-Vis Raman	Agua de río e hígado de pollo	[214]
AuNPs	60	ICP-MS	Plantas	[215]
AuNPs	< 100 (Prisma, octaedro)	CE-DAD, TEM	No especificado	[216]
AgNPs AuNPs	10 – 20 22 – 26	Fluorimetría	Agua potable y de río	[217]
PtNPs	5 30 50	AF4-ICP-MS	Aguas naturales y sintéticas	[218]
PtNPs PdNPs	5 – 30	CE-ICP-MS	Suplementos dietéticos	[219]
Al ₂ O ₃ NPs	50 – 90	ICP-MS	Pasta	[220]
TiO ₂ NPs	5 (Anatasa) 60 (Rutilo)	Raman, CE-DAD	Alimentos azucarados	[221]
TiO ₂ NPs	30 – >100	ICP-OES	Productos de confitería, chicles, chocolates y productos blanqueados	[222]
TiO ₂ NPs	< 100	ICP-TOF-MS	Suelos	[223]

Tabla I.3. Selección de algunos ejemplos relevantes que implican la determinación de NPs de naturaleza inorgánica en los ámbitos medioambiental y alimentario (continuación).

Tipo de NP (Analito)	Tamaño (nm)	Técnica utilizada	Matriz	Referencia
TiO ₂ NPs ZnONPs	20 – 60 25 – 60	SEM-EDS, spICP-OES	Almidón de maíz, almidón de ñame, harina de trigo	[224]
ZnONPs	24 – 71	spICP-MS	Aguas de diferente procedencia	[225]
ZnONPs	< 80	spICP-MS, TEM	Aguas naturales	[226]
ZnONPs	< 35 < 100	AF4, TEM, XRD, DLS	Aguas de diferente procedencia	[227]
SiO ₂ NPs	20 50 100	CE-ELSD, TEM, spICP-MS	Sal y edulcorantes	[228]
SiO ₂ NPs	10 – 50	spICP-OES	Alimentos no especificados	[229]
SiO ₂ NPs	30 – 60	AF4-spICP-MS	Sopa de tomate	[230]
SiO ₂ NPs	12	AF4-spICP-MS TEM	Crema de café	[231]
CuONPs	35 – 60	spICP-MS	Suelos y aguas naturales	[232]
CeO ₂ NPs	98	SEC-spICP-MS, TEM, DLS, Potencial Z	Aguas de diferente procedencia	[233]
CdSe-QDs	3.1 3.6 4.3 4.9	CE-DAD/LIF, TEM	No especificado	[234]
CdSe/ZnS-QDs AuNPs	< 10 5 – 50	SEC-spICP-MS	Agua de río	[235]

AF4: Fraccionamiento de flujo de campo-flujo asimétrico; **CE:** Electroforesis capilar; **CV:** Voltametría cíclica; **DAD:** Detector de diodo array; **DLS:** Dispersión dinámica de la luz; **EDS:** Espectroscopía de rayos X de energía dispersiva; **ELSD:** Detector evaporativo de dispersión de luz; **spICP:** Plasma acoplado inductivamente de una partícula; **LIF:** Fluorescencia inducida por láser; **MEKC:** Cromatografía electrocinética micelar; **OES:** Espectrometría de emisión óptica; **SEC:** Cromatografía de exclusión por tamaño; **SEM:** Microscopía electrónica de barrido; **TEM:** Microscopía electrónica de transmisión; **TOF:** Detector de tiempo de vuelo; **XRD:** Difracción de rayos X.

I.2.3. Nanomateriales como herramientas y objetos analíticos: contribución al desarrollo de la “tercera vía”

Hasta ahora se han definido las dos líneas de trabajo clásicas de AN&N, las cuales implican la caracterización y/o determinación de NMs o su uso como nanoherramientas para mejorar la calidad de los procesos analíticos. En los últimos años, el Prof. Valcárcel y la Dra. López-Lorente propusieron un nuevo enfoque como una nueva ruta prometedora para extraer información fiable y más profunda de la N&N.¹¹¹ La filosofía de esta nueva perspectiva consiste en buscar efectos sinérgicos entre las dos facetas anteriores (**Figura I.19**). Por tanto, este nuevo enfoque de la AN&N implica la participación de NMs, de igual o diferente naturaleza, tanto como herramientas en las distintas etapas del procedimiento (preparación de muestras, separación cromatográfica o electroforética o detección, por ejemplo, como absorbentes, fases estacionarias y pseudoestacionarias, soportes inertes y activos, conductores eléctricos o sensores fluoróforos) como objetos (analitos) en el mismo proceso analítico; es decir, la determinación de NMs a partir de otros NMs. El grupo de químicos analíticos promotor de la nueva perspectiva mencionada observó que, al relacionarse nanoanalitos y nanoherramientas en el mismo proceso, se consiguen procesos de caracterización, detección y determinación con mejores prestaciones. Esta denominada *tercera vía* es una alternativa complementaria a las dos facetas clásicas de AN&N la cual ha tenido un éxito notable entre la comunidad científica.

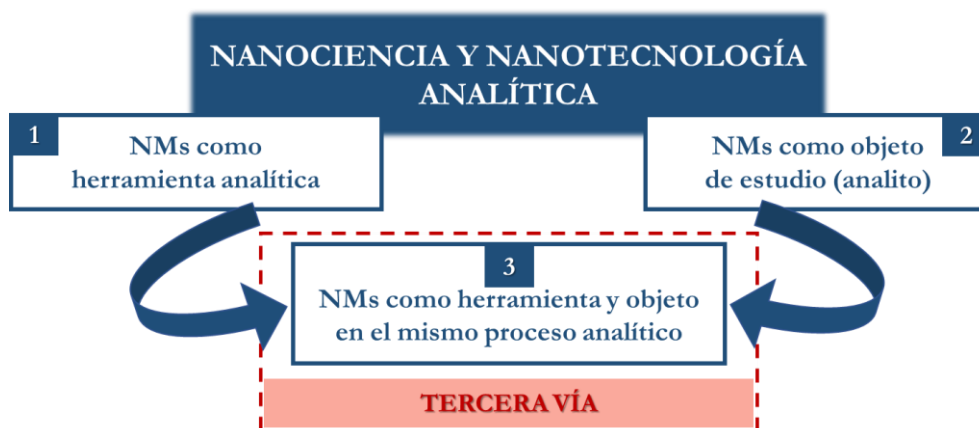


Figura I.19. Facetas de AN&N según el papel que desempeñan los NMs en el proceso analítico. Las dos facetas clásicas (1 y 2) y la combinación de ambas que implica la participación simultánea de nanoestructuras como herramienta y objeto en un mismo proceso analítico (3).

En definitiva, el objetivo principal de la *tercera vía* es mejorar lo ya existente en este ámbito y desarrollar nuevos y prometedores enfoques para la caracterización y determinación de NMs, a fin de extraer información veraz y contrastada del mundo nanométrico. Este objetivo se apoya en la investigación de sinergias entre las propiedades únicas de los NMs que en este caso actúan tanto como analitos como herramientas, es decir, la interacción entre ellas en un mismo proceso analítico mejorando sus propiedades individuales o combinadas²³⁶ y, con ello, las diferentes características analíticas de mayor importancia (exactitud y recuperación), las básicas (precisión, sensibilidad y selectividad) y las productivas (rapidez, costes y riesgos).

No obstante, la determinación de otras nanoestructuras mediante NMs también viene acompañada de algunas limitaciones o necesidades como es el control exhaustivo de la síntesis de las nanoherramientas que serán utilizadas con fines analíticos, entre otras. De lo contrario, muchas de las propiedades que dependen de las características del material se verán alteradas. Un ejemplo de ello es la relación estrecha que existe entre las propiedades ópticas de las NPs metálicas²³⁷ o semiconductoras²³⁸ con el tamaño de partícula, como se mostró en la **Figura I.9**. Por lo tanto, es esencial lograr una elevada reproducibilidad entre lotes de síntesis para el análisis de muestras como se comentó con anterioridad. De otro modo, para solventar la limitación de la presencia de interferentes en una matriz en muchos casos se realiza la funcionalización de las nanoestructuras dando como resultado una mejora en la selectividad del NM deseado y, en otros casos, es necesario un pretratamiento de la muestra para extraer el NM a analizar.

En este sentido, son múltiples las posibilidades que podrían estar consideradas en el marco de este nuevo enfoque con el fin de contribuir en este sentido a la nanometrología analítica. Atendiendo a diferentes criterios, se pueden distinguir cinco clasificaciones no contradictorias, pero sí complementarias: (1) la diferencia entre ambas nanoestructuras (misma o distinta naturaleza), (2) el papel que juega cada nanoestructura (herramienta, por ejemplo fluoróforos, adsorbentes, conductores eléctricos, u objeto de estudio, por ejemplo aditivos, contaminantes, componente de una formulación), (3) la técnica instrumental involucrada (hasta la fecha, las técnicas más utilizadas son las espectroscopías de fluorescencia y Raman), (4) el tipo de

interacción entre las dos nanoestructuras involucradas (enlace químico, interacciones hidrofóbicas/hidrofílicas y electrostáticas, mecanismos de adsorción y procesos hospedador-huésped) y (5) el tipo de nanoestructura considerada como referencia para la descripción del proceso analítico. A pesar de su importancia estratégica, hasta el momento se han publicado escasas aplicaciones, para lo que de ellas se espera, que utilicen los NMs como herramientas para la determinación de otras estructuras nanométricas.

Gran parte de las todavía escasas aplicaciones que operan en el ámbito de la *tercera vía* de la AN&N se centran en el uso de NMs para mejorar las técnicas de detección siendo capaces de cuantificar y caracterizar NMs. No obstante, existen varios ejemplos del uso de NMs para mejorar algunas otras etapas del procedimiento analítico, como el pretratamiento de la muestra. Algunos de los procedimientos analíticos más interesantes y que han sido evaluados en matrices alimentarias o medioambientales se describen a continuación.

I.2.3.1. Nanomateriales metálicos como herramienta de análisis para la determinación de otros nanomateriales

Existen muchos tipos de NPs con base metálica formadas por metales nobles como el oro, la plata o el platino, entre otros, que se utilizan como potenciales herramientas analíticas para caracterizar y/o determinar otras nanoestructuras gracias a su fenómeno LSPR característico. La espectroscopía Raman es una de las técnicas más utilizadas que incorpora nanoestructuras de esta naturaleza pudiendo incluso determinar otras de otra naturaleza. Como se ha comentado anteriormente, la adsorción de nanoestructuras en superficies metálicas rugosas es una estrategia que produce una mejora de la señal de dispersión Raman, lo que da como resultado una técnica mejorada conocida como SERS, que compensa la falta de sensibilidad de la que carece la espectroscopía Raman convencional. Un ejemplo de ello es un enfoque novedoso basado en la técnica SERS para la determinación de nanotubos de carbono de pared simple carboxilados (c-SWCNTs) en muestras de agua de río.²³⁹ Para ello, se realizó una microfiltración sucesiva de una disolución de AuNPs y de la muestra de agua que contenía c-SWCNTs mediante el uso de una membrana de acetato de

celulosa. Dicha membrana, de pequeño tamaño de poro, retiene primero las AuNPs para producir el sustrato activo SERS y posteriormente concentra los CNTs. Los resultados obtenidos mostraron una mejora considerable en la señal de la banda G característica de los CNTs en presencia del sustrato SERS de AuNPs. Los datos de intensidad SERS obtenidos se ajustaron estrechamente a una isoterma de Langmuir (**Figura I.20**).

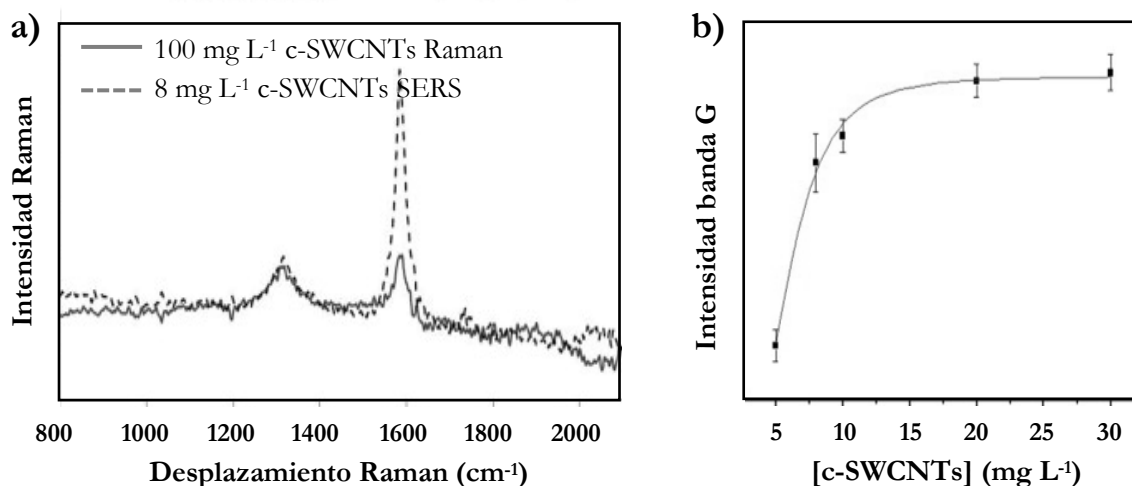


Figura I.20. (a) Perfiles Raman (línea continua) y SERS (línea discontinua) de c-SWCNTs. (b) Intensidad de la banda G a diferentes concentraciones de c-SWCNTs utilizando la membrana de acetato de celulosa impregnada con la disolución de AuNPs (sustrato SERS activo). La línea continua corresponde a la ecuación de Langmuir calculada a la que se ha ajustado el conjunto de datos. Copyright © 2013, Elsevier.

Otra metodología analítica basada en el fenómeno SERS que implica NPs metálicas y que contribuye a esta nueva perspectiva de la AN&N es la recientemente desarrollada por Montes y col.²⁴⁰ En este caso se ha diseñado una plataforma a base de AuNPs en forma de nanohuesos para la cuantificación de nanoemulsiones de quercetina, el flavonoide más abundante y habitual en la dieta humana. La nanoherramienta de detección plasmónica ha permitido alcanzar factores de intensificación de la señal Raman del flavonoide de hasta 10^3 como consecuencia de una distribución homogénea de puntos calientes o de máxima intensificación entre las nanoemulsiones y las AuNPs y sus subsiguientes acoplamientos LSPR. La **Figura I.21** refleja la potenciación obtenida de la señal Raman de la nanoformulación de quercetina gracias a la interacción entre ambas nanoestructuras. En este caso, la

plataforma SERS ha sido preparada en estado líquido con el fin evaluar el sistema líquido-bifásico, utilizado como objeto de estudio, sin alterar su estructura nativa. El enfoque nanométrico SERS fue implementado y validado de manera fiable en muestras de suplementos dietéticos de nuevo diseño que contienen el bioactivo nanoencapsulado. Como se comentó anteriormente, en relación a este tipo de analitos (NOMs), diseñados como herramienta para la encapsulación, liberación controlada y mejora de las propiedades de los bioactivos, la mayor parte de las investigaciones se centran en la caracterización de sus propiedades fisicoquímicas. Sin embargo, los estudios publicados generalmente no abordan su cuantificación, la cual es necesaria para controlar su presencia en matrices alimentarias. Algunos de los métodos desarrollados para la cuantificación de este tipo de NPs emplean técnicas de separación las cuales alteran el estado original del NOM, cuantificando por tanto el analito liberado de la encapsulación, no siendo posible de esta forma su estudio sin destruir su estructura nativa. A este respecto, es importante destacar la presente contribución SERS.

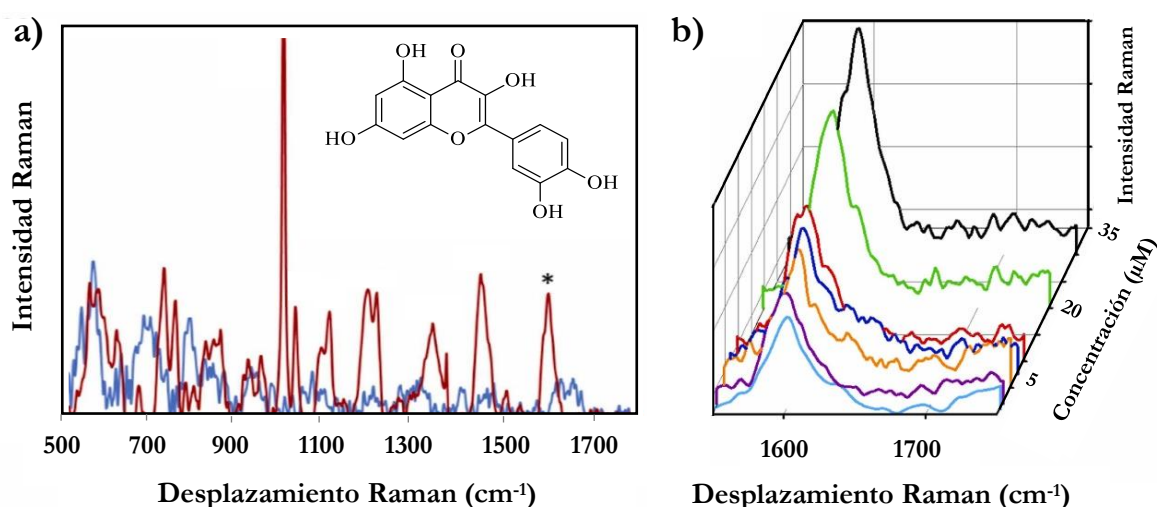


Figura I.21. (a) Perfiles Raman (línea azul) y SERS (línea roja) de nanoemulsiones de quercetina. Las concentraciones de quercetina correspondientes a las señales Raman y SERS son de $3.2 \cdot 10^{-4}$ y $1 \cdot 10^{-6}$ M, respectivamente. (b) Señal analítica seleccionada para la cuantificación de nanoemulsiones de quercetina correspondiente a concentraciones entre 0,5 y 30 μ M en presencia de AuNPs. Copyright © 2022, Elsevier.

Continuando con esta línea, algunos autores han desarrollado sensores basados en nanocristales o NCs de metales nobles, los cuales a pesar de que carecen de una absorción SPR significativa, exhiben excelentes propiedades luminiscentes en comparación con las NPs de tamaño ligeramente mayor siendo, por tanto, idóneos como detectores fluorescentes fotoestables reemplazando así a los fluoróforos orgánicos habituales. Un ejemplo es la contribución desarrollada por Zhong y col.,²⁴¹ quienes han propuesto el uso de CuNCs fluorescentes para la detección sencilla y sensible de GO en muestras de agua ambiental. Para obtener NCs metálicos estables y monodispersos, comúnmente se utilizan estabilizadores para proteger su superficie y evitar así su agregación.^{242, 243} En este caso, se utilizó 6-SH- β -ciclodextrina (6-SH- β cd) como estabilizador en la síntesis de los CuNCs (6-SH- β cd-CuNCs). La actuación del sensor se basa en la extinción de la fluorescencia de los CuNCs en presencia de GO como resultado de las interacciones por enlace de hidrógeno producidas entre el GO y 6-SH- β cd, alcanzándose un LOD de 0,1 mg L⁻¹. El ajuste lineal del *quenching* fluorescente siguió la ecuación de Stern-Volmer y fue producido a través de un mecanismo dinámico corroborado a través de medidas realizadas a diferentes temperaturas (**Figura I.22**). La fluorescencia de la nanoestructura sensora resultó ser estable a diferentes valores de pH y en presencia de una amplia variedad de iones lo que favoreció de forma exitosa la monitorización del GO bajo diferentes condiciones de pH en matrices reales.

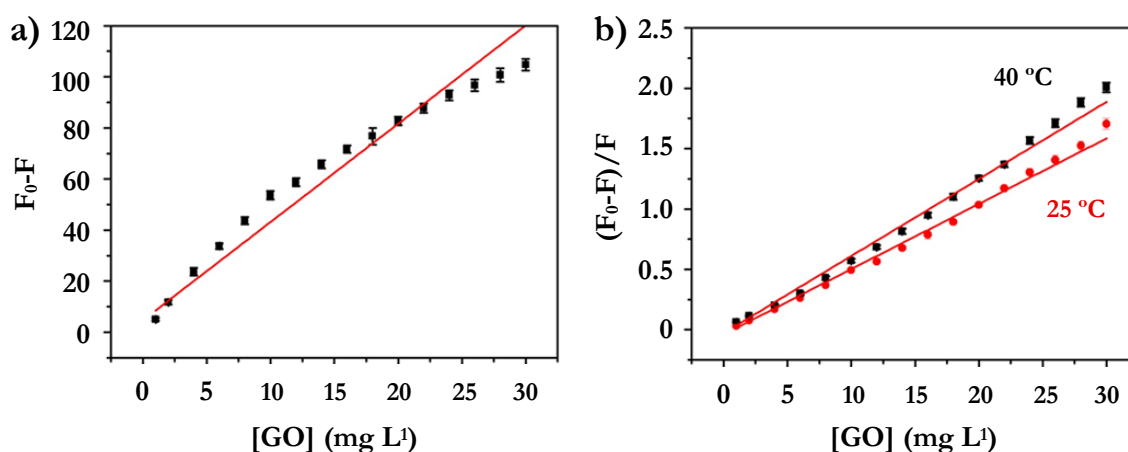


Figura I.22. Representaciones gráficas de (a) Lineweaver-Burk y (b) Stern-Volmer basadas en la extinción de la fluorescencia de los 6-SH- β cd-CuNCs en presencia de GO a diferente temperatura. Copyright © 2017, Wiley.

Otro procedimiento que hace uso de estructuras metálicas como nanoherramientas cuando el objeto de estudio es otra nanoestructura es la utilización de Fe₃O₄NPs funcionalizadas con poli(1-vinilimidazol) para la adsorción de AgNPs, desarrollando así un nuevo enfoque que combina la MSPE con la espectrometría de absorción atómica en horno de grafito (GFAAS) para la especiación de AgNPs en muestras de aguas ambientales.²⁴⁴

I.2.3.2. Nanomateriales semiconductores como herramienta para determinar otros nanomateriales

Los QDs son materiales de pocos nanómetros de tamaño cuyas excelentes propiedades fotoluminiscentes les permiten ser ampliamente utilizados como nanosensores incluso en el reconocimiento de otros NMs. La metodología fluorimétrica establecida por Carrillo-Carrión y col.²⁴⁵ es un ejemplo de ello. En ella, se utilizan QDs de seleniuro de cadmio/sulfuro de zinc (CdSe/ZnS) revestidos de macrociclos de tipo p-tertbutilcalix[80]areno como sensor para la determinación de fullereno C₆₀ en muestras de agua. Esta modificación de la superficie de los QDs permite el reconocimiento molecular del fullereno, el cual presenta una estructura π -conjugada, creando un complejo de inclusión (interacción hospedador-huésped) y produciendo un efecto de extinción de la fluorescencia original de los calixareno-QDs de acuerdo con la ecuación de Stern-Volmer. La **Figura I.23** muestra un esquema de dicho procedimiento de reconocimiento, el cual fue aplicado al análisis de muestras de agua de río dopadas previo pretratamiento mediante una extracción líquido-líquido, aprovechando la elevada afinidad del fullereno por tolueno.

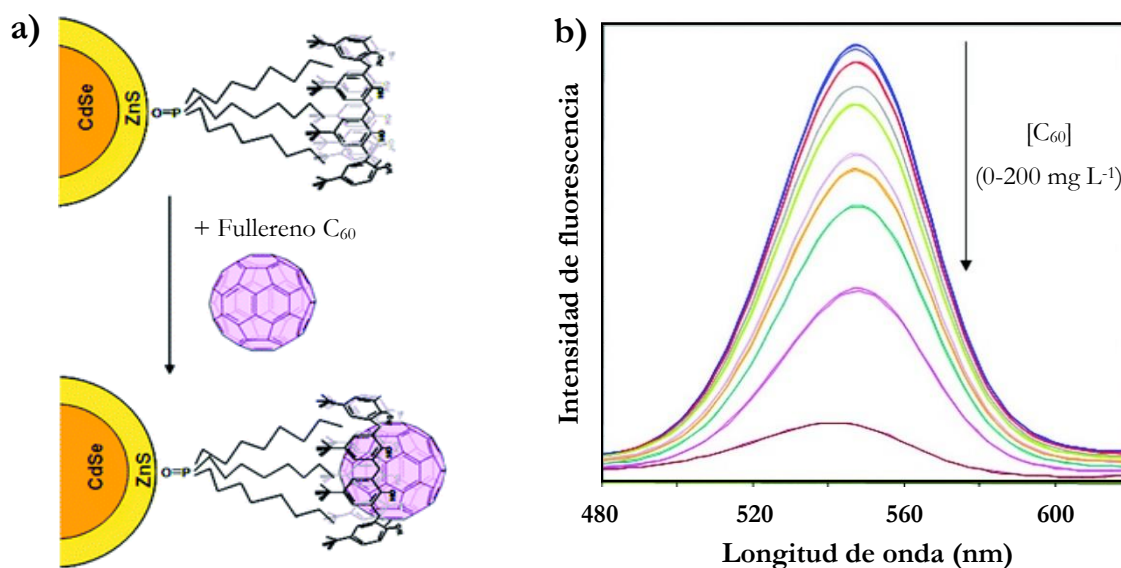


Figura I.23. (a) Formación del complejo supramolecular entre el fullereno C_{60} (huésped, atenuador) y el calixareno-QDs (receptor). (b) Espectro de emisión fluorescente ($\lambda_{exc} = 400$ nm) del calixareno-QDs en ausencia (línea azul) y en presencia de concentraciones crecientes de C_{60} . Copyright © 2011, American Chemical Society.

I.2.3.3. Nanomateriales de carbono como herramienta para la determinación de otros nanomateriales

En cuanto a las nanoestructuras de carbono, este espacio se centra en las metodologías desarrolladas que impliquen su uso como herramienta analítica en el tratamiento de muestra, como materiales adsorbentes, o como sensores. Principalmente, el grupo de NMs basados en carbono como nanoherramienta analítica incluye CNTs, grafeno y materiales derivados de nanopuntos de carbono (CDs).¹⁸¹ Una metodología en la que los NMs basados en carbono actúan como sorbente para la posterior determinación de otros NMs de la misma naturaleza fue desarrollada por López-Lorente y col.²⁴⁶ En este trabajo, se propone un enfoque Raman sensible para la preconcentración y determinación de c-SWCNTs utilizando como sorbente una membrana de celulosa modificada con nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNTs). Para la modificación, se filtró una dispersión de MWCNTs en Tritón X-100 a través de la membrana y, seguidamente, las muestras de agua de río previamente enriquecidas con c-SWCNTs. Por último, la membrana se lavó con una mezcla de KOH-MeOH a pH 12 a fin de eliminar los posibles interferentes orgánicos presentes en la muestra. Los análisis Raman se llevaron a cabo

directamente en la membrana del filtro que contenía ambos tipos de CNTs. El proceso de filtrado de la muestra enriquecida con c-SWCNTs permitió su retención debido a interacciones π - π con los MWCNTs previamente inmovilizados en la membrana. En el procedimiento Raman desarrollado se utilizan los MWCNTs como referencia espectral para cuantificar c-SWCNTs mediante el análisis de la relación de alturas de las bandas G/D, a la que ambos tipos de CNTs contribuyen al espectro, en función de la cantidad de analito retenido en el filtro (**Figura I.24**). Es decir, los MWCNTs presentes en la membrana desempeñan una doble función, por un lado, actúan como componentes activos para mejorar la retención de los c-SWCNTs y, por otro lado, permiten la determinación del analito, ya que se utilizan como referencia espectral Raman para cuantificar los c-SWCNTs analizando la magnificación de la banda G en función de la cantidad de analito acumulado. Finalmente, este procedimiento se aplicó en la determinación de c-SWCNTs en aguas de río.

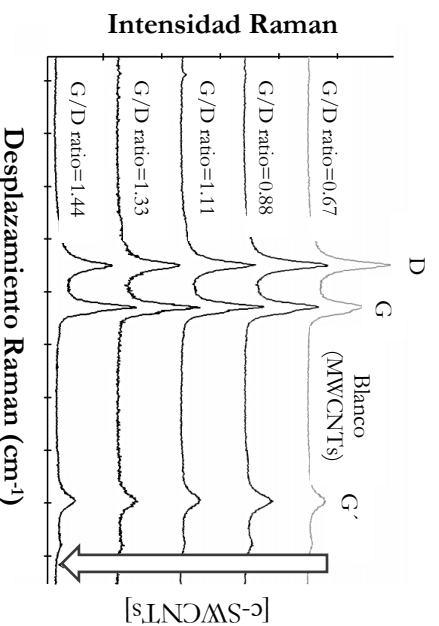


Figura I.24. Progresión de la relación de alturas de las bandas G/D al aumentar la cantidad de c-SWCNTs retenida por la membrana modificada con MWCNTs. Copyright © 2013, American Chemical Society.

Otro procedimiento sencillo en el que están implicadas nanoestructuras basadas en carbono en el tratamiento de muestra de matrices que contienen otras nanoestructuras de distinta naturaleza es el desarrollado por Ruíz-Palomero y col.²⁴⁷ La estructura única de la nanocelulosa, la cual ha mostrado ser medioambientalmente respetuosa, está despertando un interés significativo como material adsorbente de NPs metálicas. Para ello, se llevó a cabo una microextracción dispersiva en fase sólida (D- μ SPE) previa a un análisis electroforético. En este ejemplo concreto, la

introducción de grupos sulfonato con carga negativa en la superficie de la nanocelulosa mejora su química superficial y permite la extracción y preconcentración efectiva de AgNPs en matrices alimentarias en presencia de un surfactante catiónico, en virtud de la alta afinidad del azufre hacia los metales. Finalmente, antes de realizar los análisis mediante CE, las NPs metálicas se desorbieron con ayuda de una solución acuosa que contenía ácido tióctico o lipoico sin necesidad de una limpieza laboriosa.

Por otro lado, varios tipos de NMs de carbono, tales como los nanopuntos basados en carbono (CDs o también llamados puntos poliméricos (PDs), CQDs y GQDs) son ampliamente utilizados como sensores fluorescentes. Aunque en menor medida, el GO también es empleado como sonda fluorescente, no obstante, presenta importantes actividades nanoadsorbentes y extintoras de fluorescencia. Los CDs son básicamente nanopuntos cuasi-esféricos con un núcleo estructural desordenado y carecen de confinamiento cuántico mientras que, de lo contrario, también existen nanopuntos que presentan confinamiento cuántico y estructura mayormente cristalina. Dentro de estos últimos se puede distinguir entre los puntos cuánticos cuasi-esféricos denominados CQDs o la lámina π -conjugada denominada GQDs. La principal diferencia entre los CQDs y los GQDs reside en que los primeros constan de estructuras confusas en las que existe una combinación de nanoláminas de grafeno con carbono amorfo como núcleo y los segundos constan de una estructura cristalina bien definida.²⁴⁸ Actualmente, se está intentando sustituir a los QDs como fluoróforos por los basados en carbono debido a la elevada toxicidad mostrada por los primeros.

Un ejemplo de NMs basados en carbono que actúan en el proceso de detección de otras partículas nanoestructuradas de diferente naturaleza fue reportado por Cayuela y col.²⁴⁹ En este método, se propone el uso de CDs como quimiosensor fluorescente de AuNPs estabilizadas con citrato sódico. Para ello, se llevó a cabo la funcionalización los CDs con grupos tiol, la cual implicaba una reacción de amidación con cisteamina para introducir dichos grupos terminales en la superficie. Dicha funcionalización fue llevada a cabo con objeto de mejorar las propiedades fotoluminiscentes del NM y la selectividad del método propuesto. La elevada afinidad de estos grupos funcionales por los átomos de oro permite atenuar la intensidad de fluorescencia de los CDs en presencia de las AuNPs formando los nanohíbridos de

CDs-AuNPs (**Figura I.25**). Este método fue aplicado para la cuantificación de AuNPs en muestras de agua potable enriquecidas y tejidos de mejillón, a las que fue necesario agregar un agente quelante, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), para garantizar la interacción selectiva con el analito de estudio.

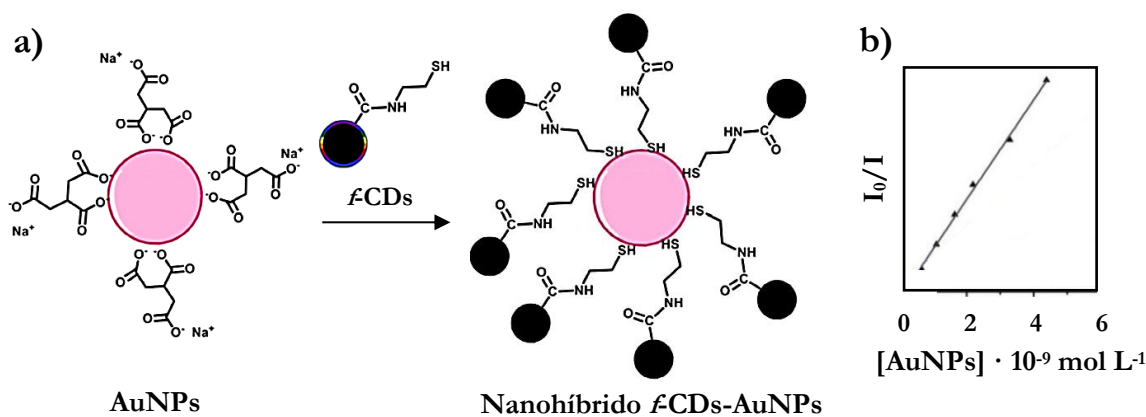


Figura I.25. (a) Formación de los nanohíbridos de CDs-AuNPs permitiendo la determinación de AuNPs mediante la inhibición de la intensidad fluorescente de los CDs funcionalizados (*f*-CDs). (b) Curva de calibración obtenida a partir del proceso de *quenching* producido por las AuNPs sobre la señal de emisión de los *f*-CDs, atendiendo a la ecuación de Stern-Volmer. Copyright © 2014, Elsevier.

I.2.3.4. Nanomateriales híbridos como herramienta para la determinación de otros nanomateriales

Finalmente, algunos NMs con dos o más tipos de nanocomponentes también se han utilizado como herramienta para contribuir a la nanometrología analítica. Los nanocompuestos o nanohíbridos se caracterizan por exhibir propiedades complementarias o sinérgicas ayudando a la mejora de los métodos analíticos gracias a su incorporación.

La capacidad fluorescente del GO no es tan elevada con respecto a otras NPs fluorescentes basadas en carbono. Con el objetivo de mejorar o potenciar su fluorescencia, Li y col. diseñaron NPs híbridas de Au@SiO₂ las cuales fueron adsorbidas sobre nanoláminas de GO (**Figura I.26a**).²⁵⁰ La cubierta de sílice tiene como función controlar la distancia entre el núcleo de oro y el fluoróforo. Se utilizó un polielectrolito catiónico, clorhidrato de polialilamina (PAAHC), para acoplar el revestimiento de sílice con el GO cargado negativamente, mediante la tecnología de ensamblaje electrostático capa por capa. En definitiva, la estructura multicapa de

Au@SiO_2 presenta un núcleo de oro y se encuentra rodeada por una cubierta de sílice con un espesor controlado y uniforme la cual evita que el metal extinga la fluorescencia nativa del GO a distancias cortas. En la **Figura I.26b**, se muestran los espectros de emisión del GO obtenidos al evaluar dos espesores diferentes de sílice de las Au@SiO_2 , concretamente 20 ($\text{Au@SiO}_2\text{-20}$) y 80 nm ($\text{Au@SiO}_2\text{-80}$). Dado que $\text{Au@SiO}_2\text{-20}$ y $\text{Au@SiO}_2\text{-80}$ no tienen propiedades fluorescentes, la intensidad fluorescente de los tres espectros proviene de la fluorescencia de las nanoláminas de GO. Los resultados obtenidos tras caracterizar la morfología y las características ópticas de las nuevas partículas híbridas preparadas revelaron que, para un espesor del revestimiento de 20 nm la intensidad de la emisión fluorescente del GO aumenta drásticamente con respecto a la nativa, debido a la mejora del metal. Sin embargo, para un grosor de 80 nm la intensidad de la emisión del GO disminuye drásticamente con respecto a la anterior. Esto puede ser debido a que en este último caso el revestimiento de sílice sea demasiado grueso para que el núcleo de oro afecte a la fluorescencia del GO. Por lo tanto, en este trabajo, el espesor del espaciador de sílice de 20 nm demostró ser una distancia efectiva para la mejora de la fluorescencia del metal. Por tanto, se pudo concluir que al utilizar un revestimiento de 20 nm de espesor se triplica la intensidad de fluorescencia del GO, apoyando a lo que se conoce como fluorescencia mejorada por metales cuando el GO actúa como fluoróforo.

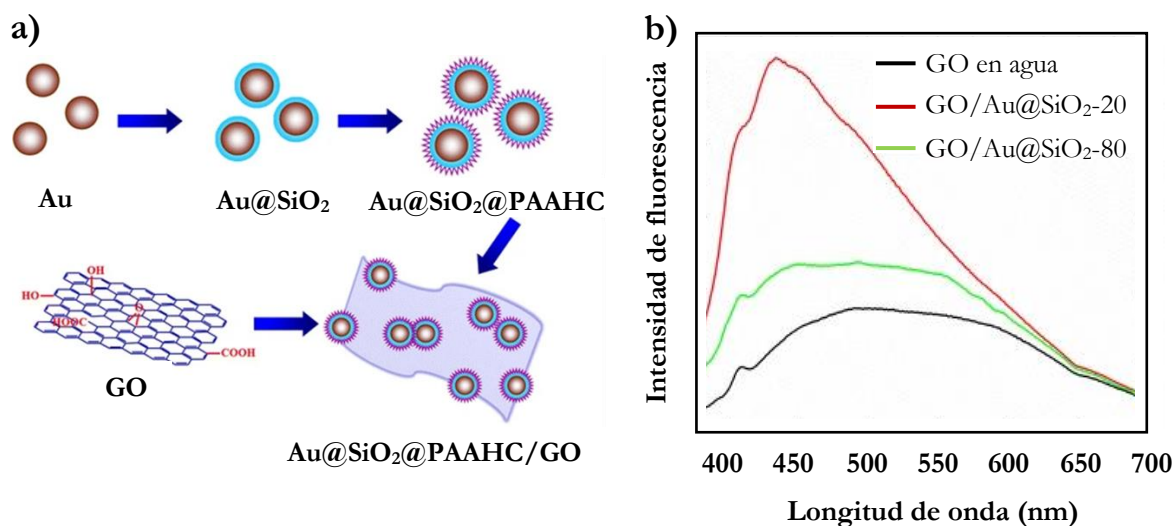


Figura I.26. (a) Ilustración del proceso de la preparación de las nanoláminas de GO unidas a las NPs híbridas de $\text{Au@SiO}_2\text{@PAAHC}$. (b) Intensidad de emisión fluorescente del GO en ausencia (línea negra) y en presencia de Au@SiO_2 NPs adsorbidas con un espesor del revestimiento de sílice de 20 nm (línea roja) y 80 nm (línea verde). Copyright © 2014, Springer.

A pesar de las innumerables ventajas y consecuentes propiedades que puede tener un aumento tan significativo de una propiedad óptica, el objetivo podría ir mucho más allá. Asimismo, se podría lograr la detección y/o cuantificación de las Au@SiO₂@PAAHCNPs ensayando concentraciones variables de oro o, incluso, que la combinación de todas ellas (Au@SiO₂@PAAHC@GO) sirva como sonda sensora de otro analito, ya sea o no en forma nanoestructurada dando como resultado una estrategia muy prometedora en el que se puedan detectar varios analitos en cadena.

En el año 2017, Khinevich y col.²⁵¹ desarrollaron otro procedimiento rápido para la detección y estudio estructural del fullereno C₆₀ pero esta vez mediante SERS, utilizando para ello AgNPs sobre silicio poroso como sustrato híbrido efectivo como ya había sido descrito anteriormente.²⁵² El espesor de las capas de silicio fue de 5 μm con un diámetro medio de los poros de 60 nm. Las partículas nanométricas de plata se formaron sobre el silicio mediante deposición química a partir de una solución acuosa de AgNO₃. Los resultados obtenidos mediante este estudio revelaron la potenciación de la señal Raman para una detección más sensible y, a su vez, se observaron cambios estructurales en las moléculas del fullereno debido a la oxidación producida en atmósfera ambiente en comparación con una atmósfera controlada.

Además de las aplicaciones puramente analíticas, existen otras aplicaciones que hacen uso de NPs y, por ejemplo, actúan como catalizadores eficientes para la síntesis de otras estructuras nanométricas.²⁵³

En definitiva, dados los interesantes ejemplos descritos este nuevo enfoque es muy prometedor y de gran relevancia no solo en el ámbito de la Química Analítica, sino también de la N&N aunque, hasta el momento, el alto potencial de esta *tercera aproximación* no se ha explotado lo suficiente por ser ésta una faceta relativamente reciente.

I.2.4. Estrategia analítica dual de los nanomateriales: una nueva perspectiva

De forma alternativa a los tres enfoques de la AN&N descritos hasta la actualidad y anteriormente detallados, en esta Tesis Doctoral se propone por primera vez una nueva orientación alternativa basada en estrategias sensoras duales de NMs y otros analitos. Dichas estrategias abordan, por una parte, la utilización de NM para cuantificar analitos de distinta naturaleza y a su vez, estos mismos analitos actúan como sensores del NM utilizado. Es decir, en un mismo proceso analítico el sistema sensor permite cuantificar dos de los componentes que lo forman, donde uno de ellos es un NM. Teniendo en cuenta esta estrategia, se podría proponer un único proceso analítico para cuantificar individualmente compuestos químicos con características fisicoquímicas similares empleando un mismo NM. Además, cualquiera de esos compuestos podría actuar como potencial sensor del NM en diversas matrices. En definitiva, un mismo NM puede actuar como herramienta analítica o analito a detectar en el mismo proceso analítico.

Por otra parte, con un enfoque similar que también se englobaría dentro de estas estrategias sensoras duales, sería la utilización de una molécula indicadora que interviene como plataforma sensora de NMs y a su vez, el sistema formado por ambos componentes actúa indirectamente como nanosensor para cuantificar otros analitos.

Los dos enfoques propuestos anteriormente podrían suponer la fusión de las dos primeras vías a las cuales hace alusión la AN&N, a diferencia de la *tercera vía* donde un NM actúa como herramienta analítica para la detección de otro NM distinto dentro de un mismo proceso analítico.¹¹¹ Así, también se puede obtener una información mucho más completa de la que se obtiene al realizar investigaciones en las que se contribuye a la primera o segunda vía de forma independiente.

Dicha fusión se propone en esta Tesis Doctoral como *cuarta orientación* del uso de la N&N enfocada a la Química Analítica que, incluso, podría evolucionar hacia la detección de múltiples analitos ya sea de forma simultánea o implementando varios procesos enlazados. Dichos procesos podrían implicar varios compuestos químicos junto con un mismo NM o mezclas de ambos. La **Figura I.27** esquematiza las

propuestas sensoras pertenecientes a la nueva orientación de la AN&N planteada en esta Memoria. La nueva orientación anteriormente comentada se ha denominado “Estrategia analítica dual de los NMs”.

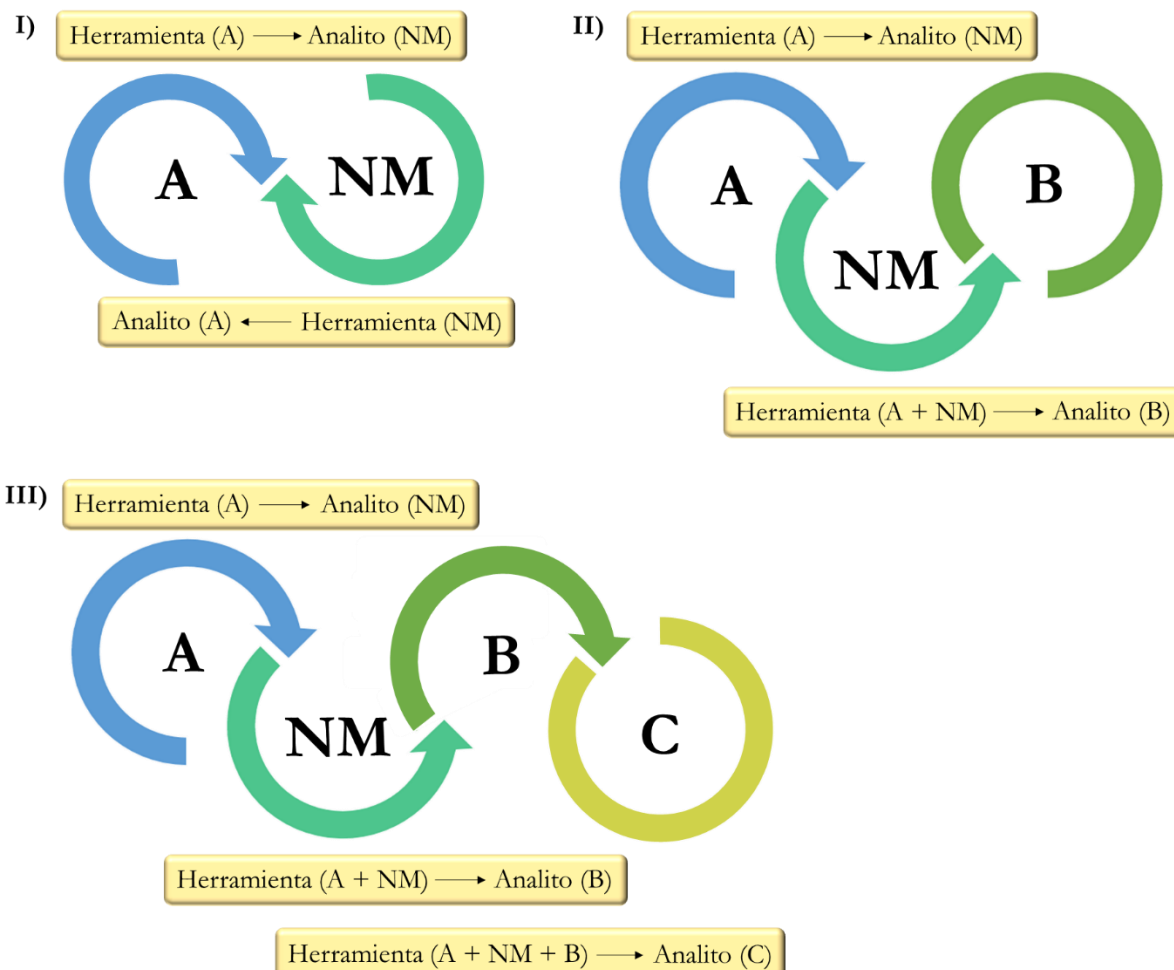


Figura I.27. Estrategias duales de la AN&N que implican el uso de NMs.

Teniendo en cuenta esta perspectiva, en esta Memoria se ha contribuido a la misma con dos trabajos de investigación en los cuales están implicados o bien NMs de carbono o bien NPs metálicas junto con aditivos alimentarios. En uno de ellos, se desarrolla una estrategia analítica con detección dual basada en SERS donde se determinan AuNPs en diferentes muestras, gracias a la magnificación gradual que produce dicho NM sobre la señal Raman de colorantes alimentarios. Para la aplicación de la metodología se seleccionó eritrosina. Además, este colorante fue cuantificado en muestras alimentarias usando el mismo NM como plataforma sensora. En este punto conviene puntualizar que la metodología propuesta en esta investigación podría haber

sido empleada con cualquier molécula sensora que aporte una señal Raman lo suficientemente intensificada cuando entra en contacto con la superficie de NPs metálicas.

Por otro lado, también se ha desarrollado una metodología basada en la señal fluorescente de riboflavina, la cual es utilizada como herramienta analítica en el proceso de detección para la determinación de diferentes estructuras de GO. Esta determinación es el resultado de la desactivación de la fluorescencia de la molécula sensora al formarse el complejo no fluorescente riboflavina-GO. Por otro lado, este complejo es utilizado como sonda sensora de catequina cuya detección se basa en la recuperación gradual de la fluorescencia de riboflavina. En la metodología analítica planteada, ambas determinaciones (GO y catequina) son llevadas a cabo mediante medidas de emisión fluorescente de riboflavina.

En el Capítulo IV de la presente Memoria se hace una descripción más pormenorizada de los procedimientos duales propuestos.

Referencias

1. Feynman, R. There's plenty of room at the bottom (reprint from speech given at annual meeting of the American Physical Society). *Engineering Science* **1960**, *23*, 22-36.
2. Kroto, H. W.; Heath, J. R.; O'Brien, S. C.; Curl, R. F.; Smalley, R. E. C₆₀: Buckminsterfullerene. *Nature* **1985**, *318*(6042), 162-163.
3. Iijima, S. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature* **1991**, *354*(6348), 56-58.
4. Valcárcel, M.; Alario, M. Á. Las nanoestructuras de carbono en la nanociencia y nanotecnología analíticas. *Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales* **2010**.
5. Diario Oficial de la Unión Europea. Recomendación de la Comisión de 18 de octubre de 2011 relativa a la definición de nanomaterial (2011/696/UE) **2011**.
6. Mildau, G.; Huber, B. The New EC Cosmetics Regulation 1223/2009 Contents and First Explanations. *SÖFW-Journal* **2010**, *136*(3), 40-60.
7. Som, C.; Berges, M.; Chaudhry, Q.; Dusinska, M.; Fernandes, T. F.; Olsen, S. I.; Nowack, B. The importance of life cycle concepts for the development of safe nanoproducts. *Toxicology* **2010**, *269*(2-3), 160-169.
8. Leitgeb, N.; Auvinen, A.; Danker-Hopfe, H.; Mild, K. Potential health effects of exposure to electromagnetic fields (EMF). *Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENIHR) Opinion on Potential Health* **2016**, *10*, 75635-75922.
9. Yokoyama, T.; Masuda, H.; Suzuki, M.; Ehara, K.; Nogi, K.; Fuji, M.; Fukui, T.; Suzuki, H.; Tatami, J.; Hayashi, K. Basic properties and measuring methods of nanoparticles. In *Nanoparticle Technology Handbook*, Elsevier **2008**, pp 3-48.
10. Khan, I.; Saeed, K.; Khan, I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry* **2019**, *12*(7), 908-931.
11. Valcárcel, M.; López-Lorente, Á. I. *Gold nanoparticles in Analytical Chemistry*, Elsevier **2014**.

12. Machado, S.; Pacheco, J.; Nouws, H.; Albergaria, J. T.; Delerue-Matos, C. Characterization of green zero-valent iron nanoparticles produced with tree leaf extracts. *Science of the Total Environment* **2015**, *533*, 76-81.
13. Dolez, P. I. Nanomaterials definitions, classifications, and applications. In *Nanoengineering*, Elsevier **2015**, pp 3-40.
14. Daniszewska, A.; Łojkowski, W.; Fecht, H. J.; Kurzydłowski, K. J.; Narkiewicz, U.; Salishchev, G. A.; Zehetbauer, M.; Kulczyk, M.; Chmielecka, M.; Kuzmenko, D. Metallic nano-materials and nanostructures: Development of technology roadmap. In *Solid State Phenomena* **2006**, *114*, 345-392.
15. Sannino, D. Types and Classification of Nanomaterials. In *Nanotechnology*, Springer **2021**, pp 15-38.
16. Saleh, T. A. Nanomaterials: Classification, properties, and environmental toxicities. *Environmental Technology and Innovation* **2020**, *20*, 101067-101082.
17. EPA. Technical fact sheet–Nanomaterials **2017**.
18. Mansoori, G. A.; George, T. F.; Zhang, G.; Assoufid, L. *Molecular building blocks for Nanotechnology: from diamondoids to nanoscale materials and applications*, Springer **2007**.
19. Fahlman, B. D. Nanomaterials. In *Materials Chemistry*, Springer **2018**, pp 485-641.
20. Álvarez, L. C. La revolución Nanotecnológica en los nuevos materiales. Un reto tecnológico para el siglo XXI. Universidad de Jaén XVII *Curso de Geotecnia Aplicada, España* **2015**.
21. Trapiella-Alfonso, L.; Llano-Suárez, P.; Fernández-Argüelles, M. T.; Sanz-Medel, A.; Costa-Fernández, J. M. Analytical nanoscience and nanotechnology. In *Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications, Theory and Instrumentation*, Wiley **2017**, 1-28.
22. Duan, S.; Du, Z.; Fan, H.; Wang, R. Nanostructure optimization of platinum-based nanomaterials for catalytic applications. *Nanomaterials* **2018**, *8*(11), 949-968.

23. Gómez-López, P.; Puente-Santiago, A.; Castro-Beltrán, A.; do Nascimento, L. A. S.; Balu, A. M.; Luque, R.; Alvarado-Beltrán, C. G. Nanomaterials and catalysis for green chemistry. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry* **2020**, *24*, 48-55.
24. Ramalingam, G.; Kathirgamanathan, P.; Ravi, G.; Elangovan, T.; Manivannan, N.; Kasinathan, K. Quantum confinement effect of 2D nanomaterials. In *Quantum Dots-Fundamental and Applications*, IntechOpen **2020**, pp 11-22.
25. Rabouw, F. T.; Donega, C. M. Excited-state dynamics in colloidal semiconductor nanocrystals. *Topics in Current Chemistry* **2016**, *374*(58), 1-30.
26. Díaz-González, M.; Escosura-Muñiz, A. d. l.; Fernandez-Argüelles, M. T.; Alonso, F. J. G.; Costa-Fernández, J. M. Quantum dot bioconjugates for diagnostic applications. In *Surface-modified Nanobiomaterials for Electrochemical and Biomedicine Applications*, Springer **2020**, 133-176.
27. Yang, E.; Zhang, Y.; Shen, Y. Quantum dots for electrochemiluminescence bioanalysis-A review. *Analytica Chimica Acta* **2021**, *1209*, 339140-339160.
28. Willets, K. A.; Van Duyne, R. P. Localized surface plasmon resonance spectroscopy and sensing. *Annual Review of Physical Chemistry* **2007**, *58*, 267-297.
29. Garrido, S. C. Polímeros de impronta molecular micro y nanoestructurados para la fabricación de sensores ópticos. Universidad Complutense de Madrid **2017** (Tesis doctoral).
30. Li, M.; Cushing, S. K.; Wu, N. Plasmon-enhanced optical sensors: a review. *Analyst* **2015**, *140*(2), 386-406.
31. Bartolomé, M.; Contento, A. M.; Villaseñor, M. J.; Ríos, Á. Innovative and versatile nanoplasmonic approach for the full sensing of proteinogenic aminoacids in nutritional supplements. *Talanta* **2022**, *237*, 122976-122987.
32. Huang, P. C.; Gao, N.; Li, J. F.; Wu, F. Y. Colorimetric detection of methionine based on anti-aggregation of gold nanoparticles in the presence of melamine. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2018**, *255*, 2779-2784.
33. Singh, R.; Thakur, P.; Thakur, A.; Kumar, H.; Chawla, P.; V. Rohit, J.; Kaushik, R.; Kumar, N. Colorimetric sensing approaches of surface-modified gold and silver

nanoparticles for detection of residual pesticides: a review. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* **2021**, 101(15), 3006-3022.

34. Perumal, J.; Wang, Y.; Attia, A. B. E.; Dinish, U.; Olivo, M. Towards a point-of-care SERS sensor for biomedical and agri-food analysis applications: A review of recent advancements. *Nanoscale* **2021**, 13(2), 553-580.

35. Jeong, Y.; Kook, Y.-M.; Lee, K.; Koh, W. G. Metal enhanced fluorescence (MEF) for biosensors: General approaches and a review of recent developments. *Biosensors and Bioelectronics* **2018**, 111, 102-116.

36. Fukumori, Y. N., Toshiyuki; Adschiri, T.; Ohara, S.; Saito, F.; Naito, M.; Okuyama, K.; Kawahara, M.; Suzuki, H.; Sasaki, T.; Fuji, M.; Inagari, S. In *Nanoparticle Technology Handbook*, Elsevier **2018**, pp 49-107.

37. Lucena, R.; Simonet, B.; Cárdenas, S.; Valcárcel, M. Potential of nanoparticles in sample preparation. *Journal of Chromatography A* **2011**, 1218(4), 620-637.

38. Mourdikoudis, S.; Pallares, R. M.; Thanh, N. T. Characterization techniques for nanoparticles: comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties. *Nanoscale* **2018**, 10(27), 12871-12934.

39. Hodoroaba, V.-D.; Unger, W.; Shard, A. *Characterization of nanoparticles: Measurement processes for nanoparticles*, Elsevier **2019**.

40. Campbell, J.; Burkitt, S.; Dong, N.; Zavaleta, C. Nanoparticle characterization techniques. In *Nanoparticles for Biomedical Applications*, Elsevier **2020**, pp 129-144.

41. Hall, J. B.; Dobrovolskaia, M. A.; Patri, A. K.; McNeil, S. E. Characterization of nanoparticles for therapeutics. *Nanomedicine* **2007**, 2(6), 789-803.

42. Patri, A. K.; Dobrovolskaia, M. A.; Stern, S. T.; McNeil, S. E. Preclinical characterization of engineered nanoparticles intended for cancer therapeutics. In *Nanotechnology for cancer therapy*, CRC Press **2006**, pp 105-137.

43. Barhoum, A.; García-Betancourt, M. L. Physicochemical characterization of nanomaterials: Size, morphology, optical, magnetic, and electrical properties. In *Emerging applications of nanoparticles and architecture nanostructures*, Elsevier **2018**, pp 279-304.

44. Balasubramanian, S.; Kala, S. M. J.; Pushparaj, T. L. Biogenic synthesis of gold nanoparticles using *Jasminum auriculatum* leaf extract and their catalytic, antimicrobial and anticancer activities. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* **2020**, *57*, 101620-101631.
45. García, R. Á. F.; Fernández-Iglesias, N.; López-Chaves, C.; Sánchez-González, C.; Llopis, J.; Montes-Bayón, M.; Bettmer, J. Complementary techniques (spICP-MS, TEM, and HPLC-ICP-MS) reveal the degradation of 40 nm citrate-stabilized Au nanoparticles in rat liver after intraperitoneal injection. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **2019**, *55*, 1-5.
46. Khashan, K. S.; Jabir, M. S.; Abdulameer, F. A. Carbon Nanoparticles prepared by laser ablation in liquid environment. *Surface Review and Letters* **2019**, *26*(10), 1950078-19550092.
47. Gu, M.; Li, Y.; Li, X.; Hu, S.; Zhang, X.; Xu, W.; Thevuthasan, S.; Baer, D. R.; Zhang, J. G.; Liu, J. In situ TEM study of lithiation behavior of silicon nanoparticles attached to and embedded in a carbon matrix. *ACS Nano* **2012**, *6*(9), 8439-8447.
48. Titus, D.; Samuel, E. J. J.; Roopan, S. M. Nanoparticle characterization techniques. In *Green synthesis, characterization and applications of nanoparticles*, Elsevier **2019**, pp 303-319.
49. Lapresta-Fernández, A.; Salinas-Castillo, A.; Anderson De La Llana, S.; Costa-Fernández, J. M.; Domínguez-Meister, S.; Cecchini, R.; Capitán-Vallvey, L.; Moreno-Bondi, M.; Marco, M.-P.; Sánchez-López, J. C. A general perspective of the characterization and quantification of nanoparticles: imaging, spectroscopic, and separation techniques. *Critical Reviews in Solid State and Materials Sciences* **2014**, *39*(6), 423-458.
50. Lahiji, R. R.; Xu, X.; Reifenberger, R.; Raman, A.; Rudie, A.; Moon, R. J. Atomic force microscopy characterization of cellulose nanocrystals. *Langmuir* **2010**, *26*(6), 4480-4488.
51. Gadegaard, N. Atomic force microscopy in biology: technology and techniques. *Biotechnic and Histochemistry* **2006**, *81*(2-3), 87-97.

52. Georgiev, P.; Bojinova, A.; Kostova, B.; Momekova, D.; Bjornholm, T.; Balashev, K. Implementing atomic force microscopy (AFM) for studying kinetics of gold nanoparticle's growth. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2013**, *434*, 154-163.
53. López-Serrano, A.; Olivas, R. M.; Landaluze, J. S.; Cámara, C. Nanoparticles: a global vision. Characterization, separation, and quantification methods. Potential environmental and health impact. *Analytical Methods* **2014**, *6*(1), 38-56.
54. Lin, P. C.; Lin, S.; Wang, P. C.; Sridhar, R. Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials. *Biotechnology Advances* **2014**, *32*(4), 711-726.
55. Mazza, T.; Barborini, E.; Piseri, P.; Milani, P.; Cattaneo, D.; Bassi, A. L.; Bottani, C. E.; Ducati, C. Raman spectroscopy characterization of TiO₂ rutile nanocrystals. *Physical Review B* **2007**, *75*(4), 045416-045420.
56. Kafle, B. P. *Chemical Analysis and Material Characterization by Spectrophotometry*, Elsevier **2019**.
57. Alula, M. T.; Mengesha, Z. T.; Mwenesongole, E. Advances in surface-enhanced Raman spectroscopy for analysis of pharmaceuticals: A review. *Vibrational Spectroscopy* **2018**, *98*, 50-63.
58. Pilot, R.; Signorini, R.; Durante, C.; Orian, L.; Bhamidipati, M.; Fabris, L. A review on surface-enhanced Raman scattering. *Biosensors* **2019**, *9*(2), 57-155.
59. Madey, T. E.; Yates Jr, J. T. *Vibrational spectroscopy of molecules on surfaces*, Springer **2013**.
60. Ataka, K.; Heberle, J. Biochemical applications of surface-enhanced infrared absorption spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2007**, *388*(1), 47-54.
61. Sharma, B.; Frontiera, R. R.; Henry, A.-I.; Ringe, E.; Van Duyne, R. P. SERS: Materials, applications, and the future. *Materials Today* **2012**, *15*(1-2), 16-25.
62. Aroca, R. Surface-enhanced Raman scattering. In *Surface-Enhanced Vibrational Spectroscopy*, Wiley **2006**, pp 73-106.

63. Schwartzberg, A. M.; Zhang, J. Z. Novel optical properties and emerging applications of metal nanostructures. *The Journal of Physical Chemistry C* **2008**, *112*(28), 10323-10337.
64. Moskovits, M. Surface-enhanced Raman spectroscopy: a brief retrospective. *Journal of Raman Spectroscopy* **2005**, *36*(6-7), 485-496.
65. Cantor, C.; Schimmel, P. *Biophysical Chemistry, Part II: Techniques for the study of biological structure and function*, WH Freeman **1980**.
66. Raval, N.; Maheshwari, R.; Kalyane, D.; Youngren-Ortiz, S. R.; Chougule, M. B.; Tekade, R. K. Importance of physicochemical characterization of nanoparticles in pharmaceutical product development. In *Basic Fundamentals of Drug Delivery*, Elsevier **2019**, pp 369-400.
67. Biju, V.; Itoh, T.; Ishikawa, M. Delivering quantum dots to cells: bioconjugated quantum dots for targeted and nonspecific extracellular and intracellular imaging. *Chemical Society Reviews* **2010**, *39*(8), 3031-3056.
68. Sapsford, K. E.; Tyner, K. M.; Dair, B. J.; Deschamps, J. R.; Medintz, I. L. Analyzing nanomaterial bioconjugates: a review of current and emerging purification and characterization techniques. *Analytical Chemistry* **2011**, *83*(12), 4453-4488.
69. Jiang, W.; Kim, B. Y.; Rutka, J. T.; Chan, W. C. Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent. *Nature Nanotechnology* **2008**, *3*(3), 145-150.
70. Hühn, J.; Carrillo-Carrión, C.; Soliman, M. G.; Pfeiffer, C.; Valdeperez, D.; Masood, A.; Chakraborty, I.; Zhu, L.; Gallego, M.; Yue, Z. Selected standard protocols for the synthesis, phase transfer, and characterization of inorganic colloidal nanoparticles. *Chemistry of Materials* **2017**, *29*(1), 399-461.
71. Ma, Y.; Choi, T. W.; Cheung, S. H.; Cheng, Y.; Xu, X.; Xie, Y. M.; Li, H. W.; Li, M.; Luo, H.; Zhang, W. Charge transfer-induced photoluminescence in ZnO nanoparticles. *Nanoscale* **2019**, *11*(18), 8736-8743.
72. Bian, F.; Sun, L.; Cai, L.; Wang, Y.; Zhao, Y. Quantum dots from microfluidics for nanomedical application. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* **2019**, *11*(5), 1567-1585.

73. Singh, A. K. *Engineered nanoparticles: structure, properties and mechanisms of toxicity*, Academic Press **2015**.
74. Zhou, Y. G.; Rees, N. V.; Compton, R. G. The electrochemical detection and characterization of silver nanoparticles in aqueous solution. *Angewandte Chemie International Edition* **2011**, *50*(18), 4219-4221.
75. Douglas, F.; Yanez, R.; Ros, J.; Marín, S.; De La Escosura-Muñiz, A.; Alegret, S.; Merkoçi, A. Silver, gold and the corresponding core shell nanoparticles: synthesis and characterization. *Journal of Nanoparticle Research* **2008**, *10*(1), 97-106.
76. Pumera, M.; Aldavert, M.; Mills, C.; Merkoçi, A.; Alegret, S. Direct voltammetric determination of gold nanoparticles using graphite-epoxy composite electrode. *Electrochimica Acta* **2005**, *50*(18), 3702-3707.
77. Mansfield, E.; Kar, A.; Hooker, S. A. Applications of TGA in quality control of SWCNTs. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2010**, *396*(3), 1071-1077.
78. Pang, L. S.; Saxby, J. D.; Chatfield, S. P. Thermogravimetric analysis of carbon nanotubes and nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry* **1993**, *97*(27), 6941-6942.
79. Arjan, J. An integrated AFM-Raman instrument for studying heterogeneous catalytic systems: a first showcase. *Chemical Communications* **2012**, *48*(12), 1742-1744.
80. Brucherseifer, M.; Kranz, C.; Mizaikoff, B. Combined in situ atomic force microscopy-infrared-attenuated total reflection spectroscopy. *Analytical Chemistry* **2007**, *79*(22), 8803-8806.
81. Wiedemair, J.; Moon, J.-S.; Eaton, D.; Mizaikoff, B.; Kranz, C. Combined AFM-SECM: Towards a novel platform for imaging microbiosensors. In *World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering*, Springer **2009**, pp 372-375.
82. Dazzi, A.; Prater, C. B.; Hu, Q.; Chase, D. B.; Rabolt, J. F.; Marcott, C. AFM-IR: combining atomic force microscopy and infrared spectroscopy for nanoscale chemical characterization. *Applied Spectroscopy* **2012**, *66*(12), 1365-1384.
83. Grinter, D. C.; Pang, C. L.; Muryin, C. A.; Maccherozzi, F.; Dhesi, S. S.; Thornton, G. Characterising ultrathin ceria films at the nanoscale: Combining

spectroscopy and microscopy. *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena* **2014**, *195*, 13-17.

84. Villaseñor, M.; Ríos, Á. Nanomaterials for water cleaning and desalination, energy production, disinfection, agriculture and green chemistry. *Environmental Chemistry Letters* **2018**, *16*(1), 11-34.

85. Teradal, N. L.; Jelinek, R. Carbon nanomaterials in biological studies and biomedicine. *Advanced Healthcare Materials* **2017**, *6*(17), 1700574-1700609.

86. Kapat, K.; Shubhra, Q. T.; Zhou, M.; Leeuwenburgh, S. Piezoelectric nanobiomaterials for biomedicine and tissue regeneration. *Advanced Functional Materials* **2020**, *30*(44), 1909045-1909065.

87. Corps, A. I.; Rodríguez-Fariñas, N.; Guzmán, F. J.; Rodríguez, R. C.; Ríos, Á. Screening-confirmation strategy for nanomaterials involving spectroscopic analytical techniques and its application to the control of silver nanoparticles in pastry samples. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2021**, *246*, 119015-119020.

88. Turan, N. B.; Erkan, H. S.; Engin, G. O.; Bilgili, M. S. Nanoparticles in the aquatic environment: Usage, properties, transformation and toxicity—A review. *Process Safety and Environmental Protection* **2019**, *130*, 238-249.

89. Song, Y.; Li, X.; Du, X. Exposure to nanoparticles is related to pleural effusion, pulmonary fibrosis and granuloma. *European Respiratory Journal* **2009**, *34*(3), 559-567.

90. Piperigkou, Z.; Karamanou, K.; Engin, A. B.; Gialeti, C.; Docea, A. O.; Vynios, D. H.; Pavão, M. S.; Golokhvast, K. S.; Shtilman, M. I.; Argiris, A. Emerging aspects of nanotoxicology in health and disease: from agriculture and food sector to cancer therapeutics. *Food and Chemical Toxicology* **2016**, *91*, 42-57.

91. Soenen, S. J.; Rivera-Gil, P.; Montenegro, J.-M.; Parak, W. J.; De Smedt, S. C.; Braeckmans, K. Cellular toxicity of inorganic nanoparticles: common aspects and guidelines for improved nanotoxicity evaluation. *Nano Today* **2011**, *6*(5), 446-465.

92. Yang, Y.; Qin, Z.; Zeng, W.; Yang, T.; Cao, Y.; Mei, C.; Kuang, Y. Toxicity assessment of nanoparticles in various systems and organs. *Nanotechnology Reviews* **2017**, *6*(3), 279-289.
93. Chrishtop, V. V.; Prilepskii, A. Y.; Nikonorova, V. G.; Mironov, V. A. Nanosafety vs. nanotoxicology: adequate animal models for testing in vivo toxicity of nanoparticles. *Toxicology* **2021**, *462*, 152952-152967.
94. Buzea, C.; Pacheco, I. I.; Robbie, K. Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases* **2007**, *2*(4), 17-71.
95. Shang, L.; Nienhaus, K.; Nienhaus, G. U. Engineered nanoparticles interacting with cells: size matters. *Journal of Nanobiotechnology* **2014**, *12*(1), 1-11.
96. Manke, A.; Wang, L.; Rojanasakul, Y. Mechanisms of nanoparticle-induced oxidative stress and toxicity. *BioMed Research International* **2013**, *2013*, 1-15.
97. Nel, A.; Xia, T.; Madler, L.; Li, N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* **2006**, *311*(5761), 622-627.
98. Porter, D. W.; Wu, N.; Hubbs, A. F.; Mercer, R. R.; Funk, K.; Meng, F.; Li, J.; Wolfarth, M. G.; Battelli, L.; Friend, S. Differential mouse pulmonary dose and time course responses to titanium dioxide nanospheres and nanobelts. *Toxicological Sciences* **2013**, *131*(1), 179-193.
99. Shabbir, S.; Kulyar, M. F.-e.-A.; Bhutta, Z. A.; Boruah, P.; Asif, M. Toxicological consequences of titanium dioxide nanoparticles (TiO₂NPs) and their jeopardy to human population. *BioNanoScience* **2021**, *11*(2), 621-632.
100. Rashid, M. M.; Forte Tavčer, P.; Tomšič, B. Influence of titanium dioxide nanoparticles on human health and the environment. *Nanomaterials* **2021**, *11*(9), 2354-2373.
101. Khot, L. R.; Sankaran, S.; Maja, J. M.; Ehsani, R.; Schuster, E. W. Applications of nanomaterials in agricultural production and crop protection: a review. *Crop Protection* **2012**, *35*, 64-70.

102. Gogos, A.; Knauer, K.; Bucheli, T. D. Nanomaterials in plant protection and fertilization: current state, foreseen applications, and research priorities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2012**, *60*(39), 9781-9792.
103. Chen, F.; Gerion, D. Fluorescent CdSe/ZnS nanocrystal-peptide conjugates for long-term, nontoxic imaging and nuclear targeting in living cells. *Nano Letters* **2004**, *4*(10), 1827-1832.
104. Hoshino, A.; Fujioka, K.; Oku, T.; Suga, M.; Sasaki, Y. F.; Ohta, T.; Yasuhara, M.; Suzuki, K.; Yamamoto, K. Physicochemical properties and cellular toxicity of nanocrystal quantum dots depend on their surface modification. *Nano Letters* **2004**, *4*(11), 2163-2169.
105. Batley, G. E.; Kirby, J. K.; McLaughlin, M. J. Fate and risks of nanomaterials in aquatic and terrestrial environments. *Accounts of Chemical Research* **2013**, *46*(3), 854-862.
106. Fröhlich, E. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine* **2012**, *7*, 5577-5591.
107. Goodman, C. M.; McCusker, C. D.; Yilmaz, T.; Rotello, V. M. Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains. *Bioconjugate Chemistry* **2004**, *15*(4), 897-900.
108. Chomposor, A.; Saha, K.; Ghosh, P. S.; Macarthy, D. J.; Miranda, O. R.; Zhu, Z. J.; Arcaro, K. F.; Rotello, V. M. The role of surface functionality on acute cytotoxicity, ROS generation and DNA damage by cationic gold nanoparticles. *Small* **2010**, *6*(20), 2246-2249.
109. Liu, Y.; Zhu, S.; Gu, Z.; Chen, C.; Zhao, Y. Toxicity of manufactured nanomaterials. *Particuology* **2022**, *69*, 31-48.
110. Sharifi, S.; Behzadi, S.; Laurent, S.; Forrest, M. L.; Stroeve, P.; Mahmoudi, M. Toxicity of nanomaterials. *Chemical Society Reviews* **2012**, *41*(6), 2323-2343.
110. López-Lorente, Á. I.; Valcárcel, M. The third way in analytical nanoscience and nanotechnology: Involvement of nanotools and nanoanalytes in the same analytical process. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2016**, *75*, 1-9.

112. Soriano, M. L.; Zougagh, M.; Valcárcel, M.; Ríos, Á. Analytical Nanoscience and Nanotechnology: Where we are and where we are heading. *Talanta* **2018**, *177*, 104-121.
113. Valcárcel, M.; Ríos, A. The analytical problem. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **1997**, *16*(7), 385-393.
114. Hare, J. I.; Lammers, T.; Ashford, M. B.; Puri, S.; Storm, G.; Barry, S. T. Challenges and strategies in anti-cancer nanomedicine development: An industry perspective. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2017**, *108*, 25-38.
115. Prasad, R.; Bhattacharyya, A.; Nguyen, Q. D. Nanotechnology in sustainable agriculture: recent developments, challenges, and perspectives. *Frontiers in microbiology* **2017**, *8*, 1014-1026.
116. Lugani, Y.; Oberoi, S.; Rattu, G. Nanotechnology in Food Industry—Applications and Future Perspectives. In *Sustainable Agriculture Reviews 55*, Springer **2021**, pp 71-92.
117. Jakubus, A.; Paszkiewicz, M.; Stepnowski, P. Carbon nanotubes application in the extraction techniques of pesticides: a review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **2017**, *47*(1), 76-91.
118. Feng, T.; Wang, Y.; Qiao, X. Recent advances of carbon nanotubes-based electrochemical immunosensors for the detection of protein cancer biomarkers. *Electroanalysis* **2017**, *29*(3), 662-675.
119. Zhang, P.; Yi, W.; Xu, H.; Gao, C.; Hou, J.; Jin, W.; Lei, Y.; Hou, X. Supramolecular interactions of poly [(9, 9-dioctylfluorenyl-2, 7-diyl)-co-thiophene] with single-walled carbon nanotubes. *Nanotechnology Reviews* **2018**, *7*(6), 487-495.
120. Schroeder, V.; Savagatrup, S.; He, M.; Lin, S.; Swager, T. M. Carbon nanotube chemical sensors. *Chemical Reviews* **2018**, *119*(1), 599-663.
121. Karimi, F.; Zakariae, N.; Esmacili, R.; Alizadeh, M.; Tamadon, A. M. Carbon nanotubes for amplification of electrochemical signal in drug and food analysis; a mini review. *Current Biochemical Engineering* **2020**, *6*(2), 114-119.

122. Chen, Y.; Guo, Z.; Wang, X.; Qiu, C. Sample preparation. *Journal of Chromatography A* **2008**, *1184*(1-2), 191-219.
123. Pena-Pereira, F. From conventional to miniaturized analytical systems. In *Miniaturization in Sample Preparation*, De Gruyter **2014**, pp 1-28.
124. Azzouz, A.; Kailasa, S. K.; Lee, S. S.; Rascón, A. J.; Ballesteros, E.; Zhang, M.; Kim, K.-H. Review of nanomaterials as sorbents in solid-phase extraction for environmental samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2018**, *108*, 347-369.
125. Andrade-Eiroa, A.; Canle, M.; Leroy-Cancellieri, V.; Cerdà, V. Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review (Part I). *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2016**, *80*, 641-654.
126. He, M.; Chen, Z.; Xu, C.; Chen, B.; Hu, B. Magnetic nanomaterials as sorbents for trace elements analysis in environmental and biological samples. *Talanta* **2021**, *230*, 122306-122321.
127. Plotka-Wasyłka, J.; Szczepańska, N.; de La Guardia, M.; Namieśnik, J. Modern trends in solid phase extraction: new sorbent media. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2016**, *77*, 23-43.
128. Latrous El Atrache, L.; Hachani, M.; Kefi, B. Carbon nanotubes as solid-phase extraction sorbents for the extraction of carbamate insecticides from environmental waters. *International Journal of Environmental Science and Technology* **2016**, *13*(1), 201-208.
129. Gouda, A. A.; Al Ghannam, S. M. Impregnated multiwalled carbon nanotubes as efficient sorbent for the solid-phase extraction of trace amounts of heavy metal ions in food and water samples. *Food Chemistry* **2016**, *202*, 409-416.
130. Reinholds, I.; Jansons, M.; Pugajeva, I.; Bartkevics, V. Recent applications of carbonaceous nanosorbents in solid-phase extraction for the determination of pesticides in food samples. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **2019**, *49*(5), 439-458.
131. Serrano, A.; Gallego, M. Fullerenes as sorbent materials for benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene isomers preconcentration. *Journal of Separation Science* **2006**, *29*(1), 33-40.

132. Jiménez-Soto, J. M.; Cárdenas, S.; Valcárcel, M. Evaluation of carbon nanocones/disks as sorbent material for solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A* **2009**, *1216*(30), 5626-5633.
133. Jiménez-Soto, J. M.; Cárdenas, S.; Valcárcel, M. Evaluation of single-walled carbon nanohorns as sorbent in dispersive micro solid-phase extraction. *Analytica Chimica Acta* **2012**, *714*, 76-81.
134. Huang, Y.; Fulton, A. N.; Keller, A. A. Simultaneous removal of PAHs and metal contaminants from water using magnetic nanoparticle adsorbents. *Science of the Total Environment* **2016**, *571*, 1029-1036.
135. Huang, J.; Deng, H.; Song, D.; Xu, H. Electrospun polystyrene/graphene nanofiber film as a novel adsorbent of thin film microextraction for extraction of aldehydes in human exhaled breath condensates. *Analytica Chimica Acta* **2015**, *878*, 102-108.
136. Xu, Q.; Zhang, N.; Yin, X.; Wang, M.; Shen, Y.; Xu, S.; Zhang, L.; Gu, Z. Development and validation of a nylon 6 nanofibers mat-based SPE coupled with HPLC method for the determination of docetaxel in rabbit plasma and its application to the relative bioavailability study. *Journal of Chromatography B* **2010**, *878*(26), 2403-2408.
137. Guihen, E. Nanoparticles in modern separation science. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2013**, *46*, 1-14.
138. Nilsson, C.; Birnbaum, S.; Nilsson, S. Use of nanoparticles in capillary and microchip electrochromatography. *Journal of Chromatography A* **2007**, *1168*(1-2), 212-224.
139. Neiman, B.; Grushka, E.; Lev, O. Use of gold nanoparticles to enhance capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry* **2001**, *73*(21), 5220-5227.
140. Liu, F. K. Analysis and applications of nanoparticles in the separation sciences: A case of gold nanoparticles. *Journal of Chromatography A* **2009**, *1216*(52), 9034-9047.

141. Sýkora, D.; Kašička, V.; Mikšík, I.; Řezanka, P.; Záruba, K.; Matějka, P.; Král, V. Application of gold nanoparticles in separation sciences. *Journal of Separation Science* **2010**, *33*(3), 372-387.
142. Wu, Q.; Lv, H.; Zhao, L. Applications of carbon nanomaterials in chiral separation. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2020**, *129*, 115941.
143. Nilsson, C.; Nilsson, S. Nanoparticle-based pseudostationary phases in capillary electrochromatography. *Electrophoresis* **2006**, *27*(1), 76-83.
144. Jiménez-Soto, J. M.; Moliner-Martínez, Y.; Cárdenas, S.; Valcárcel, M. Evaluation of the performance of single-walled carbon nanohorns in capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **2010**, *31*(10), 1681-1688.
145. Cao, J.; Li, P.; Yi, L. Ionic liquids coated multi-walled carbon nanotubes as a novel pseudostationary phase in electrokinetic chromatography. *Journal of Chromatography A* **2011**, *1218*(52), 9428-9434.
146. Moliner-Martínez, Y.; Barrios, M.; Cárdenas, S.; Valcárcel, M. Comparative study of carbon nanotubes and C60 fullerenes as pseudostationary phases in electrokinetic chromatography. *Journal of Chromatography A* **2008**, *1194*(1), 128-133.
147. Benítez-Martínez, S.; Simonet, B. M.; Valcárcel, M. Graphene nanoparticles as pseudostationary phase for the electrokinetic separation of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Electrophoresis* **2013**, *34*(17), 2561-2567.
148. Liu, F. J.; Ding, G. S.; Tang, A. N. Simultaneous separation and determination of five organic acids in beverages and fruits by capillary electrophoresis using diamino moiety functionalized silica nanoparticles as pseudostationary phase. *Food Chemistry* **2014**, *145*, 109-114.
149. Li, H.; Ding, G. S.; Chen, J.; Tang, A. N. Amphiphilic silica nanoparticles as pseudostationary phase for capillary electrophoresis separation. *Journal of Chromatography A* **2010**, *1217*(47), 7448-7454.
150. Zhao, T.; Zhou, G.; Wu, Y.; Liu, X.; Wang, F. Gold nanomaterials based pseudostationary phases in capillary electrophoresis: A brand-new attempt at chondroitin sulfate isomers separation. *Electrophoresis* **2015**, *36*(4), 588-595.

151. Suárez, B.; Simonet, B. M.; Cárdenas, S.; Valcárcel, M. Surfactant-coated single-walled carbon nanotubes as a novel pseudostationary phase in capillary EKC. *Electrophoresis* **2007**, *28*(11), 1714-1722.
152. Moliner-Martínez, Y.; Cárdenas, S.; Valcárcel, M. Evaluation of carbon nanostructures as chiral selectors for direct enantiomeric separation of ephedrine by EKC. *Electrophoresis* **2007**, *28*(15), 2573-2579.
153. Na, N.; Cui, X.; De Beer, T.; Liu, T.; Tang, T.; Sajid, M.; Ouyang, J. The use of silica nanoparticles for gas chromatographic separation. *Journal of Chromatography A* **2011**, *1218*(28), 4552-4558.
154. Gogoi, A.; Mazumder, N.; Konwer, S.; Ranawat, H.; Chen, N.-T.; Zhuo, G.-Y. Enantiomeric recognition and separation by chiral nanoparticles. *Molecules* **2019**, *24*(6), 1007-1037.
155. Wolfbeis, O. S. Chemical sensors—survey and trends. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* **1990**, *337*(5), 522-527.
156. Eggins, B. R. *Chemical Sensors and Biosensors*, John Wiley & Sons **2002**.
157. Hulanicki, A.; Glab, S.; Ingman, F. Chemical sensors: definitions and classification. *Pure and Applied Chemistry* **1991**, *63*(9), 1247-1250.
158. Pérez-López, B.; Merkoçi, A. Nanoparticles for the development of improved (bio) sensing systems. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2011**, *399*(4), 1577-1590.
159. Bülbül, G.; Hayat, A.; Andreescu, S. Portable nanoparticle-based sensors for food safety assessment. *Sensors* **2015**, *15*(12), 30736-30758.
160. Ben Haddada, M.; Hu, D.; Salmain, M.; Zhang, L.; Peng, C.; Wang, Y.; Liedberg, B.; Boujday, S. Gold nanoparticle-based localized surface plasmon immunosensor for staphylococcal enterotoxin A (SEA) detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2017**, *409*(26), 6227-6234.
161. Zarei, A. R.; Barghak, F. Application of the localized surface plasmon resonance of gold nanoparticles for the determination of 1, 1-dimethylhydrazine in water: toward green analytical chemistry. *Journal of Analytical Chemistry* **2017**, *72*(4), 430-436.

162. Chen, H.; Zhou, K.; Zhao, G. Gold nanoparticles: From synthesis, properties to their potential application as colorimetric sensors in food safety screening. *Trends in Food Science and Technology* **2018**, *78*, 83-94.
163. Lee, J. S.; Han, M. S.; Mirkin, C. A. Colorimetric detection of mercuric ion (Hg²⁺) in aqueous media using DNA-functionalized gold nanoparticles. *Angewandte Chemie International Edition* **2007**, *46*(22), 4093-4096.
164. Matricardi, C.; Hanske, C.; Garcia-Pomar, J. L.; Langer, J.; Mihi, A.; Liz-Marzan, L. M. Gold nanoparticle plasmonic superlattices as surface-enhanced Raman spectroscopy substrates. *ACS Nano* **2018**, *12*(8), 8531-8539.
165. Ai, Y. J.; Liang, P.; Wu, Y. X.; Dong, Q. M.; Li, J. B.; Bai, Y.; Xu, B. J.; Yu, Z.; Ni, D. Rapid qualitative and quantitative determination of food colorants by both Raman spectra and Surface-enhanced Raman Scattering (SERS). *Food Chemistry* **2018**, *241*, 427-433.
166. Gillibert, R.; Huang, J. Q.; Zhang, Y.; Fu, W. L.; de la Chapelle, M. L. Food quality control by surface enhanced Raman scattering. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2018**, *105*, 185-190.
167. D'Agostino, A.; Giovannozzi, A. M.; Mandrile, L.; Sacco, A.; Rossi, A. M.; Taglietti, A. In situ seed-growth synthesis of silver nanoplates on glass for the detection of food contaminants by surface enhanced Raman scattering. *Talanta* **2020**, *216*, 120936-120943.
168. Bora, T.; Zoepfl, D.; Dutta, J. Importance of plasmonic heating on visible light driven photocatalysis of gold nanoparticle decorated zinc oxide nanorods. *Scientific Reports* **2016**, *6*(1), 1-10.
169. Mustafa, F.; Hassan, R. Y.; Andreescu, S. Multifunctional nanotechnology-enabled sensors for rapid capture and detection of pathogens. *Sensors* **2017**, *17*(9), 2121-2148.
170. Sharma, A. S.; Ali, S.; Sabarinathan, D.; Murugavelu, M.; Li, H.; Chen, Q. Recent progress on graphene quantum dots-based fluorescence sensors for food

safety and quality assessment applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **2021**, 20(6), 5765-5801.

171. Han, Y.; Yang, W.; Luo, X.; He, X.; Zhao, H.; Tang, W.; Yue, T.; Li, Z. Carbon dots based ratiometric fluorescent sensing platform for food safety. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **2022**, 62(1), 244-260.

172. Durán, G. M.; Abellán, C.; Contento, A. M.; Ríos, Á. Discrimination of penicillamine enantiomers using β -cyclodextrin modified CdSe/ZnS quantum dots. *Microchimica Acta* **2017**, 184(3), 815-824.

173. Yum, K.; McNicholas, T. P.; Mu, B.; Strano, M. S. Single-walled carbon nanotube-based near-infrared optical glucose sensors toward in vivo continuous glucose monitoring. *Journal of Diabetes Science and Technology* **2013**, 7(1), 72-87.

174. Li, C.; Shi, G. Carbon nanotube-based fluorescence sensors. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* **2014**, 19, 20-34.

175. Tan, D.; He, Y.; Xing, X.; Zhao, Y.; Tang, H.; Pang, D. Aptamer functionalized gold nanoparticles based fluorescent probe for the detection of mercury (II) ion in aqueous solution. *Talanta* **2013**, 113, 26-30.

176. He, J. L.; Kou, W.; Li, C.; Cai, J. J.; Kong, F. Y.; Wang, W. Electrochemical sensor based on single-walled carbon nanotube-TiN nanocomposites for detecting Amaranth. *International Journal of Electrochemical Science* **2015**, 10, 10074-10082.

177. Manikandan, V. S.; Adhikari, B.; Chen, A. Nanomaterial based electrochemical sensors for the safety and quality control of food and beverages. *Analyst* **2018**, 143(19), 4537-4554.

178. Torres-Rivero, K.; Florido, A.; Bastos-Arrieta, J. Recent trends in the improvement of the electrochemical response of screen-printed electrodes by their modification with shaped metal nanoparticles. *Sensors* **2021**, 21(8), 2596-2615.

179. Murray, R. W. Nanoelectrochemistry: metal nanoparticles, nanoelectrodes, and nanopores. *Chemical Reviews* **2008**, 108(7), 2688-2720.

180. Manso, J.; Mena, M.; Yanez-Sedeno, P.; Pingarron, J. Electrochemical biosensors based on colloidal gold–carbon nanotubes composite electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2007**, *603*(1), 1-7.
181. Trojanowicz, M. Analytical applications of carbon nanotubes: a review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2006**, *25*(5), 480-489.
182. Montoro-Leal, P.; Zougagh, M.; Sánchez-Ruiz, A.; Ríos, Á.; Alonso, E. V. Magnetic graphene molecularly imprinted polypyrrole polymer (MGO@ MIPy) for electrochemical sensing of malondialdehyde in serum samples. *Microchemical Journal* **2022**, 107377-107386.
183. Montes, C.; Soriano, M. L.; Villaseñor, M. J.; Ríos, Á. Carbon-based nanodots as effective electrochemical sensing tools toward the simultaneous detection of bioactive compounds in complex matrices. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2020**, *878*, 114573-114583.
184. Murtada, K.; Jodeh, S.; Zougagh, M.; Ríos, Á. Development of an aluminium doped TiO₂ nanoparticles-modified screen printed carbon electrode for electrochemical sensing of vanillin in food samples. *Electroanalysis* **2018**, *30*(5), 969-974.
185. Benmassaoud, Y.; Murtada, K.; Salghi, R.; Zougagh, M.; Ríos, Á. Surface polymers on multiwalled carbon nanotubes for selective extraction and electrochemical determination of rhodamine B in food samples. *Molecules* **2021**, *26*(9), 2670-2680.
186. Montes, C.; Contento, A. M.; Villaseñor, M. J.; Ríos, Á. A screen-printed electrode modified with silver nanoparticles and carbon nanofibers in a nafion matrix for ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction and voltammetric assay of heterocyclic amine 8-MeIQx in food. *Microchimica Acta* **2020**, *187*(3), 1-11.
187. Torres-Rivero, K.; Torralba-Cadena, L.; Espriu-Gascon, A.; Casas, I.; Bastos-Arrieta, J.; Florido, A. Strategies for surface modification with Ag-shaped nanoparticles: Electrocatalytic enhancement of screen-printed electrodes for the detection of heavy metals. *Sensors* **2019**, *19*(19), 4249-4262.

188. Masawat, P.; Slater, J. M. The determination of tetracycline residues in food using a disposable screen-printed gold electrode (SPGE). *Sensors and Actuators B: Chemical* **2007**, *124*(1), 127-132.
189. Cinti, S.; Arduini, F.; Carbone, M.; Sansone, L.; Cacciotti, I.; Moscone, D.; Palleschi, G. Screen-printed electrodes modified with carbon nanomaterials: a comparison among carbon black, carbon nanotubes and graphene. *Electroanalysis* **2015**, *27*(9), 2230-2238.
190. Rodríguez, J.; Castañeda, G.; Lizcano, I. Electrochemical sensor for leukemia drug imatinib determination in urine by adsorptive stripping square wave voltammetry using modified screen-printed electrodes. *Electrochimica Acta* **2018**, *269*, 668-675.
191. Yang, Y.; Long, C. L.; Li, H. P.; Wang, Q.; Yang, Z. G. Analysis of silver and gold nanoparticles in environmental water using single particle-inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Science of the Total Environment* **2016**, *563*, 996-1007.
192. Baalousha, M.; Stolpe, B.; Lead, J. Flow field-flow fractionation for the analysis and characterization of natural colloids and manufactured nanoparticles in environmental systems: A critical review. *Journal of Chromatography A* **2011**, *1218*(27), 4078-4103.
193. Porter, D. W.; Hubbs, A. F.; Chen, B. T.; McKinney, W.; Mercer, R. R.; Wolfarth, M. G.; Battelli, L.; Wu, N.; Sriram, K.; Leonard, S. Acute pulmonary dose-responses to inhaled multi-walled carbon nanotubes. *Nanotoxicology* **2012**, *7*(7), 1179-1194.
194. Mendes, R. G.; Bachmatiuk, A.; Büchner, B.; Cuniberti, G.; Rummeli, M. H. Carbon nanostructures as multi-functional drug delivery platforms. *Journal of Materials Chemistry B* **2013**, *1*(4), 401-428.
195. Son, K. H.; Hong, J. H.; Lee, J. W. Carbon nanotubes as cancer therapeutic carriers and mediators. *International Journal of Nanomedicine* **2016**, *11*, 5163-5183.
196. Marchesan, S.; Kostarelos, K.; Bianco, A.; Prato, M. The winding road for carbon nanotubes in nanomedicine. *Materials Today* **2015**, *18*(1), 12-19.

197. Ranjan, S.; Dasgupta, N.; Chakraborty, A. R.; Melvin Samuel, S.; Ramalingam, C.; Shanker, R.; Kumar, A. Nanoscience and nanotechnologies in food industries: opportunities and research trends. *Journal of Nanoparticle Research* **2014**, *16*(6), 1-23.
198. Chaudhry, Q.; Scotter, M.; Blackburn, J.; Ross, B.; Boxall, A.; Castle, L.; Aitken, R.; Watkins, R. Applications and implications of nanotechnologies for the food sector. *Food Additives and Contaminants* **2008**, *25*(3), 241-258.
199. Lövestam, G.; Rauscher, H.; Roebben, G.; Klüttgen, B. S.; Gibson, N.; Putaud, J.-P.; Stamm, H. Considerations on a definition of nanomaterial for regulatory purposes. *Joint Research Centre (JRC) Reference Reports* **2010**, *80*, 1-41.
200. McClements, D. J.; Jafari, S. M. General aspects of nanoemulsions and their formulation. In *Nanoemulsions*, Elsevier **2018**, pp 3-20.
201. Mattarozzi, M.; Suman, M.; Cascio, C.; Calestani, D.; Weigel, S.; Undas, A.; Peters, R. Analytical approaches for the characterization and quantification of nanoparticles in food and beverages. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2017**, *409*(1), 63-80.
202. Montes, C.; Villaseñor, M. J.; Ríos, Á. Analytical control of nanodelivery lipid-based systems for encapsulation of nutraceuticals: Achievements and challenges. *Trends in Food Science and Technology* **2019**, *90*, 47-62.
203. Chen, L.; Remondetto, G. E.; Subirade, M. Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems. *Trends in Food Science and Technology* **2006**, *17*(5), 272-283.
204. Chen, H.; Weiss, J.; Shahidi, F. Nanotechnology in nutraceuticals and functional foods. *Food Technology* **2006**, *60*(3), 30-36.
205. Chau, C. F.; Wu, S. H.; Yen, G. C. The development of regulations for food nanotechnology. *Trends in Food Science and Technology* **2007**, *18*(5), 269-280.
206. Singh, T.; Shukla, S.; Kumar, P.; Wahla, V.; Bajpai, V. K.; Rather, I. A. Application of nanotechnology in food science: perception and overview. *Frontiers in Microbiology* **2017**, *8*, 1501-1507.

207. Montes-Bayón, M.; Bettmer, J. The use of high performance liquid chromatography—Inductively coupled plasma-mass spectrometry in the analysis of inorganic nanomaterials. In *Comprehensive Analytical Chemistry*, Elsevier **2021**, *93*, pp 285-301.
208. Laborda, F.; Bolea, E.; Cepriá, G.; Gómez, M. T.; Jiménez, M. S.; Pérez-Arantegui, J.; Castillo, J. R. Detection, characterization and quantification of inorganic engineered nanomaterials: A review of techniques and methodological approaches for the analysis of complex samples. *Analytica Chimica Acta* **2016**, *904*, 10-32.
209. Corps, A. I.; García, S. A.; Bernardo, F. J. G.; Ríos, Á.; Rodríguez, R. C. Rapid assessment of silver nanoparticle migration from food containers into food simulants using a qualitative method. *Food Chemistry* **2021**, *361*, 130091-130095.
210. Ramos, K.; Ramos, L.; Cámara, C.; Gómez-Gómez, M. Characterization and quantification of silver nanoparticles in nutraceuticals and beverages by asymmetric flow field flow fractionation coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2014**, *1371*, 227-236.
211. Stuart, E.; Tschulik, K.; Lowinsohn, D.; Cullen, J.; Compton, R. Gold electrodes from recordable CDs for the sensitive, semi-quantitative detection of commercial silver nanoparticles in seawater media. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2014**, *195*, 223-229.
212. Hetzer, B.; Burcza, A.; Gräf, V.; Walz, E.; Greiner, R. Online-coupling of AF4 and single particle-ICP-MS as an analytical approach for the selective detection of nanosilver release from model food packaging films into food simulants. *Food Control* **2017**, *80*, 113-124.
213. Franze, B.; Engelhard, C. Fast separation, characterization, and speciation of gold and silver nanoparticles and their ionic counterparts with micellar electrokinetic chromatography coupled to ICP-MS. *Analytical Chemistry* **2014**, *86*(12), 5713-5720.
214. López-Lorente, A.; Simonet, B.; Valcárcel, M. Rapid analysis of gold nanoparticles in liver and river water samples. *Analyst* **2012**, *137*(15), 3528-3534.
215. Wei, W. J.; Li, L.; Gao, Y. P.; Wang, Q.; Zhou, Y. Y.; Liu, X.; Yang, Y. Enzyme digestion combined with sp-ICP-MS analysis to characterize the

bioaccumulation of gold nanoparticles by mustard and lettuce plants. *Science of The Total Environment* **2021**, 777, 146038-146044.

216. Adelantado, C.; Algarra, M.; Zougagh, M.; Ríos, Á. Use of capillary electrophoresis for characterisation of vinyl-terminated Au nanoprisms and nanooctahedra. *Electrophoresis* **2018**, 39(12), 1437-1442.

217. Torres, M. A. M.; Veglia, A. V.; Pacioni, N. L. The fluorescence quenching of rhodamine 6G as an alternative sensing strategy for the quantification of silver and gold nanoparticles. *Microchemical Journal* **2021**, 160, 105645-105652.

218. Sánchez-Cachero, A.; López-Sanz, S.; Rodríguez-Fariñas, N.; Ríos, Á.; Rodríguez, R. C. A method based on asymmetric flow field flow fractionation hyphenated to inductively coupled plasma mass spectrometry for the monitoring of platinum nanoparticles in water samples. *Talanta* **2021**, 222, 121513-121520.

219. Qu, H.; Mudalige, T. K.; Linder, S. W. Capillary electrophoresis/inductively-coupled plasma-mass spectrometry: development and optimization of a high resolution analytical tool for the size-based characterization of nanomaterials in dietary supplements. *Analytical Chemistry* **2014**, 86(23), 11620-11627.

220. Loeschner, K.; Correia, M.; López Chaves, C.; Rokkjær, I.; Sloth, J. J. Detection and characterisation of aluminium-containing nanoparticles in Chinese noodles by single particle ICP-MS. *Food Additives and Contaminants: Part A* **2018**, 35(1), 86-93.

221. Moreno, V.; Zougagh, M.; Ríos, A. Analytical nanometrological approach for screening and confirmation of titanium dioxide nano/micro-particles in sugary samples based on Raman spectroscopy–capillary electrophoresis. *Analytica Chimica Acta* **2019**, 1050, 169-175.

222. Sungur, Ş.; Kaya, P.; Koroglu, M. Determination of titanium dioxide nanoparticles used in various foods. *Food Additives and Contaminants: Part B* **2020**, 13(4), 260-267.

223. Bland, G. D.; Battifarano, M.; Pradas del Real, A. E.; Sarret, G.; Lowry, G. V. Distinguishing Engineered TiO₂ Nanomaterials from Natural Ti Nanomaterials in

Soil Using spICP-TOFMS and Machine Learning. *Environmental Science and Technology* **2022**, *56*(5), 2990-3001.

224. Song, X.; Li, R.; Li, H.; Hu, Z.; Mustapha, A.; Lin, M. Characterization and quantification of zinc oxide and titanium dioxide nanoparticles in foods. *Food and Bioprocess Technology* **2014**, *7*(2), 456-462.

225. Majedi, S. M.; Lee, H. K.; Kelly, B. C. Chemometric analytical approach for the cloud point extraction and inductively coupled plasma mass spectrometric determination of zinc oxide nanoparticles in water samples. *Analytical Chemistry* **2012**, *84*(15), 6546-6552.

226. Fréchette-Viens, L.; Hadioui, M.; Wilkinson, K. J. Quantification of ZnO nanoparticles and other Zn containing colloids in natural waters using a high sensitivity single particle ICP-MS. *Talanta* **2019**, *200*, 156-162.

227. Amde, M.; Tan, Z. Q.; Liu, J. Separation and size characterization of zinc oxide nanoparticles in environmental waters using asymmetrical flow field-flow fractionation. *Talanta* **2019**, *200*, 357-365.

228. Adelantado, C.; Rodríguez-Fariñas, N.; Rodríguez, R. C.; Zougagh, M.; Ríos, Á. Analysis of silica nanoparticles by capillary electrophoresis coupled to an evaporative light scattering detector. *Analytica Chimica Acta* **2016**, *923*, 82-88.

229. Athinarayanan, J.; Periasamy, V. S.; Alsaif, M. A.; Al-Warthan, A. A.; Alshatwi, A. A. Presence of nanosilica (E551) in commercial food products: TNF-mediated oxidative stress and altered cell cycle progression in human lung fibroblast cells. *Cell Biology and Toxicology* **2014**, *30*(2), 89-100.

230. Grombe, R.; Charoud-Got, J.; Emteborg, H.; Linsinger, T. P.; Seghers, J.; Wagner, S.; von der Kammer, F.; Hofmann, T.; Dudkiewicz, A.; Llinas, M. Production of reference materials for the detection and size determination of silica nanoparticles in tomato soup. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2014**, *406*(16), 3895-3907.

231. Heroult, J.; Nischwitz, V.; Bartczak, D.; Goenaga-Infante, H. The potential of asymmetric flow field-flow fractionation hyphenated to multiple detectors for the

quantification and size estimation of silica nanoparticles in a food matrix. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2014**, 406(16), 3919-3927.

232. Navratilova, J.; Praetorius, A.; Gondikas, A.; Fabienke, W.; Von der Kammer, F.; Hofmann, T. Detection of engineered copper nanoparticles in soil using single particle ICP-MS. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **2015**, 12(12), 15756-15768.

233. Zhou, X. X.; Liu, J. F.; Geng, F. L. Determination of metal oxide nanoparticles and their ionic counterparts in environmental waters by size exclusion chromatography coupled to ICP-MS. *NanoImpact* **2016**, 1, 13-20.

234. Carrillo-Carrión, M. C.; Moliner-Martínez, Y.; Simonet, B. M.; Valcárcel, M. Capillary electrophoresis method for the characterization and separation of CdSe quantum dots. *Analytical Chemistry* **2011**, 83(7), 2807-2813.

235. Paydary, P.; Larese-Casanova, P. Separation and quantification of quantum dots and dissolved metal cations by size exclusion chromatography–ICP-MS. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* **2015**, 95(15), 1450-1470.

236. Cayuela, A.; Benítez-Martínez, S.; Soriano, M. L. Carbon nanotools as sorbents and sensors of nanosized objects: the third way of analytical nanoscience and nanotechnology. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2016**, 84, 172-180.

237. Gao, C.; Vuong, J.; Zhang, Q.; Liu, Y.; Yin, Y. One-step seeded growth of Au nanoparticles with widely tunable sizes. *Nanoscale* **2012**, 4(9), 2875-2878.

238. Girma, W. M.; Fahmi, M. Z.; Permadi, A.; Abate, M. A.; Chang, J.-Y. Synthetic strategies and biomedical applications of I–III–VI ternary quantum dots. *Journal of Materials Chemistry B* **2017**, 5(31), 6193-6216.

239. López-Lorente, A. I.; Simonet, B. M.; Valcárcel, M.; Mizaikoff, B. Bare gold nanoparticles mediated surface-enhanced Raman spectroscopic determination and quantification of carboxylated single-walled carbon nanotubes. *Analytica Chimica Acta* **2013**, 788, 122-128.

240. Montes, C.; Soriano, M. L.; Villaseñor, M. J.; Ríos, Á. Design of a 3D interfacial sensors liquid sensing platform based on Au-nanobones for discrimination and

quantitation of quercetin loaded nanoemulsions. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2022**, *358*, 131509-131519.

241. Zhong, Y.; He, Y.; Ge, Y.; Song, G. β -Cyclodextrin protected Cu nanoclusters as a novel fluorescence sensor for graphene oxide in environmental water samples. *Luminescence* **2017**, *32*(4), 596-601.

242. Xu, H.; Suslick, K. S. Water-Soluble fluorescent silver nanoclusters. *Advanced Materials* **2010**, *22*(10), 1078-1082.

243. Luo, G. G.; Guo, Q.-L.; Wang, Z.; Sun, C. F.; Lin, J. Q.; Sun, D. New protective ligands for atomically precise silver nanoclusters. *Dalton Transactions* **2020**, *49*(17), 5406-5415.

244. Zhao, B.; He, M.; Chen, B.; Hu, B. Ligand-assisted magnetic solid phase extraction for fast speciation of silver nanoparticles and silver ions in environmental water. *Talanta* **2018**, *183*, 268-275.

245. Carrillo-Carrión, M. C.; Lendl, B.; Simonet, B. M.; Valcárcel, M. Calix[8]arene coated CdSe/ZnS quantum dots as C60-nanosensor. *Analytical Chemistry* **2011**, *83*(21), 8093-8100.

246. López-Lorente, A. I.; Polo-Luque, M. L.; Valcárcel, M. Sequential preconcentration and on-membrane raman determination of carboxylic single-walled carbon nanotubes in river water samples. *Analytical Chemistry* **2013**, *85*(21), 10338-10343.

247. Ruíz-Palomero, C.; Soriano, M. L.; Valcárcel, M. Sulfonated nanocellulose for the efficient dispersive micro solid-phase extraction and determination of silver nanoparticles in food products. *Journal of Chromatography A* **2016**, *1428*, 352-358.

248. Cayuela, A.; Soriano, M. L.; Carrillo-Carrión, M. C.; Valcárcel, M. Semiconductor and carbon-based fluorescent nanodots: the need for consistency. *Chemical Communications* **2016**, *52*(7), 1311-1326.

249. Cayuela, A.; Soriano, M. L.; Carrión, M. C.; Valcárcel, M. Functionalized carbon dots as sensors for gold nanoparticles in spiked samples: Formation of nanohybrids. *Analytica Chimica Acta* **2014**, *820*, 133-138.

250. Li, C.; Zhu, Y.; Wang, S.; Zhang, X.; Yang, X.; Li, C. Enhanced fluorescence of graphene oxide by well-controlled Au@SiO₂ core-shell nanoparticles. *Journal of Fluorescence* **2014**, *24*(1), 137-141.
251. Khinevich, N.; Girel, K.; Bandarenka, H.; Salo, V.; Mosunov, A. Surface enhanced Raman spectroscopy of fullerene C₆₀ drop-deposited on the silvered porous silicon. *Journal of Physics: Conference Series* **2017**, *917*, 62052-62056.
252. Bandarenka, H. V.; Girel, K. V.; Bondarenko, V. P.; Khodasevich, I. A.; Panarin, A. Y.; Terekhov, S. N. Formation regularities of plasmonic silver nanostructures on porous silicon for effective surface-enhanced Raman scattering. *Nanoscale Research Letters* **2016**, *11*(1), 1-11.
253. Homma, Y. Gold nanoparticles as the catalyst of single-walled carbon nanotube synthesis. *Catalysts* **2014**, *4*(1), 38-48.

**Materiales,
instrumentación y métodos**

Capítulo

En este capítulo se enumeran y describen brevemente las diferentes herramientas analíticas empleadas durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral, incluyendo estándares y reactivos. También se incluye la instrumentación, equipos y otros materiales utilizados, describiendo con más detalle aquellos que han sido los más importantes en el trabajo experimental.

II.1. Patrones, reactivos y muestras

II.1.1. Patrones y reactivos

Los patrones, reactivos y disolventes utilizados en el trabajo experimental fueron de pureza analítica o superior. Los productos químicos empleados en esta Memoria se enumeran en la **Tabla II.1** agrupados según su finalidad. Los disolventes utilizados para preparar todas las soluciones fueron:

- Agua desionizada (sistema de purificación Milli-Q, Belford, Massachusetts, EE.UU.).
- Acetonitrilo, pureza grado HPLC, Sigma-Aldrich.
- Acetato de etilo, $\geq 99,7\%$ de pureza, Sigma-Aldrich o Fisher Chemical.
- Metanol, pureza grado HPLC, PanReac.
- Etanol, pureza grado HPLC, PanReac.
- Acetona, pureza grado HPLC, PanReac.
- Tetrahidrofurano, pureza grado HPLC, PanReac.
- Hexano, pureza grado HPLC, Sigma-Aldrich.
- Ácido nítrico, 70,0% purificado por redistilación ($\geq 99,9\%$ base de metales de traza), Sigma-Aldrich.
- Ácido sulfúrico, 99,9% de pureza, Sigma-Aldrich o 98,0% pureza, Labkem.
- Ácido clorhídrico, 37,0% de pureza, PanReac.
- Acetona, 99,9% de pureza, PanReac.

Estos disolventes se utilizaron para diferentes fines, como: (a) para preparar soluciones estándar de los analitos, (b) como medio de reacción, (c) como extractante y (d) para purificar y solubilizar los materiales.

Las disoluciones de trabajo derivadas de las soluciones madre se prepararon diariamente en el disolvente adecuado. Las disoluciones madre se mantuvieron siempre preservadas de la luz a una temperatura de 4 °C o a -18 °C para las soluciones acuosas u orgánicas, respectivamente.

Las disoluciones tampón se prepararon en agua ultrapura de calidad Milli-Q (resistividad de 18,2 MΩ cm a 25 °C) y su pH se ajustó utilizando disoluciones de NaOH 0,1 M o HCl 0,1 M, según el caso.

Tabla II.1. Reactivos utilizados en el trabajo experimental.

Reactivo	Pureza (%)	Estado (a 25 °C)	Proveedor
<u>Síntesis de nanopartículas de oro</u>			
Ácido tetracloroáurico (III) trihidratado	≥ 99,9	Sólido	Sigma-Aldrich
Citrato de sodio	≥ 99,0	Sólido	Sigma-Aldrich
<u>Síntesis y funcionalización de puntos cuánticos de grafeno</u>			
Ácido sulfúrico	98,0	Líquido	Labkem
Ácido úrico	≥ 99,0	Sólido	Alfa Aesar
Carboximetil-β-ciclodextrina	-	Sólido	Sigma-Aldrich
N,N'-diisopropilcarbodiimida	≥ 98,0	Líquido	Sigma-Aldrich
N-hidroxisuccinimida	≥ 98,0	Sólido	Sigma-Aldrich
N-tert-butoxicarbonil-etilendiamina	≥ 98,0	Líquido	Sigma-Aldrich
Trietilamina	≥ 99,0	Líquido	Sigma-Aldrich
<u>Síntesis de nanocurcumina</u>			
Polisorbato 80 (Tween 80) con ≥ 58.0% ácido oleico	-	Líquido viscoso	Sigma-Aldrich
<u>Síntesis de materiales de óxido de grafeno</u>			
Ácido nítrico	70,0	Líquido	Sigma-Aldrich
Ácido sulfúrico	≥ 99,9	Líquido	Sigma-Aldrich
Grafito en polvo	-	Sólido	Sigma-Aldrich
Hidróxido de sodio	≥ 98,0	Sólido	Sigma-Aldrich
Nitrato de sodio	≥ 99,9	Sólido	Sigma-Aldrich
Permanganato potásico	≥ 99,0	Sólido	Sigma-Aldrich
Peróxido de hidrógeno	30	Líquido	Sigma-Aldrich

Tabla II.1. Reactivos utilizados en el trabajo experimental (continuación).

Reactivo	Pureza (%)	Estado (a 25 °C)	Proveedor
<u>Utilizados en la preparación de disoluciones tampón</u>			
Acetato de sodio anhidro	≥ 99,0	Sólido	Sigma-Aldrich
Ácido 2-(<i>N</i> -morfolino)etanosulfónico	≥ 99,5	Sólido	Sigma-Aldrich
Ácido acético	≥ 99,7	Líquido	Sigma-Aldrich
Ácido clorhídrico	37,0	Líquido	PanReac
Amoníaco	30	Líquido	PanReac
Cloruro de amonio	≥ 99,5	Sólido	PanReac
Fosfato potásico monobásico	≥ 99,0	Sólido	Sigma-Aldrich
Fosfato sódico dibásico	≥ 99,0	Sólido	Sigma-Aldrich
Hidróxido de sodio	≥ 98,0	Sólido	Sigma-Aldrich
Tetraborato sódico anhidro	≥ 98,0	Sólido	Fluka Chemie
<u>Utilizados como analitos</u>			
(+)-Catequina hidratada	≥ 98,0	Sólido	Sigma-Aldrich
Ácido rojo 51 (Eritrosina B)	≥ 95,0	Sólido	Sigma-Aldrich
<i>Cis</i> -resveratrol	≥ 98,0	Sólido	Cayman Chemical
Curcumina	≥ 65,0	Sólido	Sigma-Aldrich
Curcumina (Curcumina I)	≥ 98,0	Sólido	Sigma-Aldrich
<i>L</i> -ácido ascórbico (Vitamina C)	≥ 99,7	Sólido	PanReac
Nanopartículas de oro sintetizadas	-	Líquido	-
Piridoxina (Vitamina B ₆)	≥ 98,0	Sólido	Sigma-Aldrich
Quercetina	≥ 95,0	Sólido	Sigma-Aldrich
Riboflavina (Vitamina B ₂)	≥ 98,0	Sólido	Sigma-Aldrich
<i>Trans</i> -resveratrol	≥ 99,0	Sólido	Sigma-Aldrich
<u>Utilizados como interferentes</u>			
(-)-Epicatequina	≥ 90,0	Sólido	Fluka Chemie
Ácido cítrico	≥ 99,5	Sólido	PanReac
Ácido fólico (Vitamina B ₉)	≥ 99,0	Sólido	Sigma-Aldrich
Bisdemetoxicurcumina (Curcumina III)	≥ 95,0	Sólido	Supelco
Carbonato de potasio	≥ 99,0	Sólido	Sigma-Aldrich
Carbonato sódico anhidro	≥ 99,5	Sólido	Sigma-Aldrich

Tabla II.1. Reactivos utilizados en el trabajo experimental (continuación).

Reactivo	Pureza (%)	Estado (a 25 °C)	Proveedor
Cloruro de calcio dihidratado	≥ 99,0	Sólido	Sigma-Aldrich
Cloruro de mercurio	≥ 99,5	Sólido	Sigma-Aldrich
Cloruro de potasio	≥ 99,0	Sólido	Sigma-Aldrich
Cloruro sódico	≥ 99,5	Sólido	Sigma-Aldrich
Colecalciferol (Vitamina D ₃)	≥ 98,0	Sólido	Sigma-Aldrich
<i>D</i> -(-)-fructosa	≥ 99,0	Sólido	Sigma-Aldrich
<i>D</i> -(-)-lactosa monohidratada	≥ 98,0	Sólido	Sigma-Aldrich
<i>D</i> -(+)-glucosa anhidra	≥ 99,5	Sólido	Sigma-Aldrich
<i>D</i> -(+)-sacarosa	≥ 99,5	Sólido	Sigma-Aldrich
Desmetoxicurcumina (Curcumina II)	≥ 95,0	Sólido	Supelco
Dicloruro paraquat	≥ 99,9	Sólido	Fluka Chemie
<i>DL</i> -ácido málico	≥ 99,0	Sólido	Sigma-Aldrich
Dodecil sulfato de sodio	99,0	Sólido	Sigma-Aldrich
Ergocalciferol (Vitamina D ₂)	≥ 98,0	Sólido	Sigma-Aldrich
Fosfato sódico dibásico	≥ 98,0	Sólido	PanReac
<i>L</i> -ácido ascórbico (Vitamina C)	≥ 99,7	Sólido	PanReac
<i>L</i> -ácido glutámico	≥ 99,0	Sólido	Sigma-Aldrich
<i>L</i> -alanina	≥ 98,0	Sólido	Sigma-Aldrich
<i>L</i> -lisina monohidrocloruro	≥ 98,0	Sólido	Sigma-Aldrich
Nanopartículas de titanio (60 nm APS)	99,8	Sólido	Nanostructured & Amorphous Materials, Inc.
Nitrato de amonio	≥ 99,0	Sólido	Sigma-Aldrich
Nitrato de sodio	≥ 99,0	Sólido	Sigma-Aldrich
Sulfato de magnesio	≥ 99,5	Sólido	Sigma-Aldrich
Sulfato de sodio anhidro	≥ 99,0	Sólido	PanReac
α -ácido linolénico (Omega-3)	≥ 99,0	Sólido	Sigma-Aldrich
<u>Otros reactivos utilizados</u>			
ABTS	≥ 98,0	Sólido	Sigma-Aldrich
Ácido rojo 1 (Rojo 2G)	60,0	Sólido	Sigma-Aldrich
Ácido rojo 14 (Carmoisina)	50,0	Sólido	Sigma-Aldrich
Ácido rojo 18 (Ponceau 4R)	75,0	Sólido	Sigma-Aldrich

Tabla II.1. Reactivos utilizados en el trabajo experimental (continuación).

Reactivo	Pureza (%)	Estado (a 25 °C)	Proveedor
Ácido rojo 27(Amaranto)	85,0 – 95,0	Sólido	Sigma-Aldrich
Butil-PBD	≥ 99,0	Sólido	Sigma-Aldrich
Kit Kaiser test:			
- Fenol (80% EtOH)			
- Cianuro potásico (H ₂ O/piridina)	-	Líquido	Sigma-Aldrich
- Ninhidrina (6% EtOH)			
Sulfato de quinina dihidratado	≥ 99,0	Sólido	Acros Organics
Trolox	97,0	Sólido	Sigma-Aldrich

II.1.2. Muestras analizadas

Los métodos desarrollados fueron aplicados al análisis de diferentes muestras cuyos tratamientos se describen a continuación.

Análisis de nanopartículas de oro

- Agua potable. El agua potable fue recogida directamente de un grifo del laboratorio y se filtró a través de una membrana de nylon de 0,45 μm . Se adicionaron diferentes concentraciones de nanopartículas de oro (AuNPs) y las disoluciones obtenidas se homogeneizaron agitando en vórtex. 1 mL de dicha muestra enriquecida con AuNPs se centrifugó a 4500 rpm durante 5 min. El extracto se lavó con agua desionizada repitiendo el proceso anterior tres veces. Finalmente, se eliminó el sobrenadante y las AuNPs obtenidas fueron resuspendidas en 30 μL de agua desionizada.

- Tejido de mejillones. Los mejillones frescos se lavaron con agua ultrapura. Se simuló un proceso de liofilización tratando, de forma continuada, 3 g de muestra con acetona para eliminar el agua que quedaba en su interior. Cuando el tejido de los mejillones estaba bien seco, se trituró para obtener un polvo. 0,01 g de la muestra obtenida se enriquecieron con disoluciones de diferentes concentraciones de AuNPs y se dejó secar. Posteriormente, se suspendió en 1 mL de agua ultrapura. La mezcla se homogeneizó con agitación en vórtex. Después, esta mezcla se decantó durante 10 min y el sobrenadante, que contenía las NPs, se centrifugó durante 5 min a 4500 rpm.

Posteriormente, se eliminó el sobrenadante obtenido y se lavó el extracto con agua desionizada. El proceso se repitió 3 veces. Finalmente, las AuNPs obtenidas fueron resuspendidas en 30 μ L de agua desionizada.

- Tónico facial. Diferentes alícuotas de esta muestra se enriquecieron con varias concentraciones de AuNPs y se homogeneizaron con ayuda de un vórtex durante unos segundos. 1 mL de la muestra obtenida se transfirió a un eppendorf y se trató tres veces con acetato de etilo para eliminar las impurezas orgánicas presentes en la matriz que pudieran interferir en las medidas. La fase acuosa se centrifugó a 4500 rpm durante 5 min, se eliminó el sobrenadante y el extracto se lavó con agua desionizada. Finalmente, las AuNPs obtenidas fueron resuspendidas en 30 μ L de agua desionizada.

Análisis de óxido de grafeno

- Agua potable, de río, pozo y mar. Muestras de agua de distinta procedencia fueron dopadas con diferentes concentraciones de óxido de grafeno (GO) y se homogeneizaron agitando en vórtex. A continuación, 2 mL de la muestra obtenida fueron centrifugados durante 7 min a 10000 rpm. Se eliminó cuidadosamente parte del sobrenadante hasta conseguir un volumen final de 300 μ L. Finalmente, tras este proceso de preconcentración, las muestras bien homogeneizadas se sometieron directamente al procedimiento analítico propuesto.

- Suelo arcilloso. Se doparon varias porciones de 0,3 g de muestra con diferentes concentraciones de GO y se dejaron secar. Una vez que las muestras estaban secas, cada una de estas porciones se suspendió en 1 mL de agua desionizada. Esta mezcla se mantuvo bajo agitación continua durante 5 min y posteriormente se dejó sedimentar hasta que el sobrenadante estuviese lo menos turbio posible. Los sobrenadantes obtenidos se sometieron al proceso analítico de fluorescencia para la determinación de la concentración de GO en estas matrices.

Análisis de eritrosina B

- Cerezas de cóctel. Las cerezas de cóctel se trituraron en un molino de cuchillas. Para obtener el colorante alimentario de ellas, se realizó una extracción sólido-líquido. Para ello, se añadieron 10 mL de una mezcla de etanol:agua (50%, v/v) como

extractante a 1 g de muestra triturada. Tras 2 min de agitación en vórtex y 5 min de ultrasonidos, la mezcla se filtró utilizando un embudo alemán. El sólido obtenido en el filtro se volvió a tratar con 1 mL más de la mezcla extractante y se repitió el mismo proceso hasta comprobar que no se conseguía extraer más colorante.

Análisis de curcumina y/o nanocurcumina

- Té. Se sumergió una bolsa de té de jengibre en 30 mL de agua desionizada (ajustada a pH 6 con tampón MES 15 mM) durante 5 min a temperatura ambiente. La solución de té de color marrón se filtró para eliminar cualquier partícula insoluble en suspensión y el filtrado se utilizó para preparar la solución de trabajo para el análisis. Las muestras se enriquecieron con varios niveles de concentración de curcumina y nanocurcumina y se agitaron durante 5 min antes de realizar el análisis sin ningún tratamiento previo.

- Especias de cúrcuma. Una porción de 0,05 g de especias de cúrcuma se transfirió a un matraz aforado de 5 mL, completando su volumen con etanol. La mezcla se sonicó durante 30 min y, posteriormente, la suspensión obtenida se centrifugó durante 10 min a 10000 rpm. Una vez decantada la porción de muestra no disuelta, el sobrenadante se diluyó (1:12) con agua desionizada fijando un volumen final de etanol del 30%. A continuación, se realizó otra extracción del sólido residual con 5 mL de etanol, repitiendo el proceso anterior. Finalmente, ambos extractos se analizaron para evaluar la concentración de curcumina en la muestra.

- Suplemento nutracéutico: NovaSOL curcumin (Laboratorios Cell'innov). Para el tratamiento de la formulación de curcumina, el contenido de aceite viscoso de una cápsula de este producto se disolvió y estabilizó en 1 mM de Tween 80. El pH previamente se fijó a 6 con tampón MES a una concentración final de 15 mM. La solución resultante se filtró a través de una membrana de nylon de 0,45 μ m para la estimación de la concentración de nanocurcumina en la muestra. La concentración de curcumina no encapsulada quedó retenida en el filtro.

Análisis de resveratrol

▪ Té. Se sumergió durante 5 min una bolsa de té verde en 30 mL de agua desionizada previamente calentada hasta ebullición. Una vez enfriada la muestra líquida se filtró y se diluyó 1:4 con una solución acuosa de tampón acético-acetato cuya concentración final fue de 15 mM fijando el pH a 3,5. La matriz previamente se enriqueció con *trans*-resveratrol (solución etanólica) fijando siempre el contenido de etanol al 8% del total de la muestra y se agitó durante 5 min antes de realizar el análisis.

▪ Zumos de tomate y arándanos. Las muestras fueron diluidas 1:4 consiguiendo soluciones acuosas de 15 mM de tampón acético-acetato a pH 3,5. Cada una de las matrices fue filtrada en una membrana de nylon de 0,45 µm. Las matrices previamente fueron dopadas con *trans*-resveratrol (solución etanólica) fijando siempre un 8% de etanol sobre el volumen total de la muestra. Las muestras fueron agitadas durante 5 min antes de realizar los análisis.

▪ Vino tinto. Las muestras fueron diluidas 1:4 consiguiendo soluciones acuosas de 15 mM de tampón acético-acetato a pH 3,5. La matriz se enriqueció previamente con *trans*-resveratrol (solución etanólica) fijando el contenido de etanol al 8% del total de la muestra y se agitó durante 5 min antes del análisis.

▪ Bebida energética. En primer lugar, esta muestra se desgasificó en un baño de ultrasonidos durante 10 min y posteriormente se diluyó 1:4 con una solución acuosa de tampón acético-acetato, fijando una concentración final de 15 mM a pH 3,5. La matriz se enriqueció previamente con *trans*-resveratrol (solución etanólica) fijando el contenido de etanol al 8% del total de la muestra y se agitó durante 5 min antes del análisis.

▪ Infusión de frutos rojos. Se sumergió una bolsa de infusión de frutos rojos en 200 mL de agua desionizada durante 5 min bajo un baño de hielo. La muestra líquida resultante se diluyó 1:4 con una solución acuosa de tampón acético-acetato, fijando una concentración final de 15 mM y un pH de 3,5. La matriz se enriqueció previamente con una solución etanólica de *trans*-resveratrol, estableciendo siempre el contenido de etanol en el 8% de la muestra total. Finalmente, la muestra se agitó durante 5 min antes de realizar el análisis.

▪ Suplementos nutraceuticos. *Resveradox Forte* (Laboratorios Arkopharma). El contenido de las cápsulas de resveratrol se disolvió en etanol y se filtró rápidamente en un embudo alemán provisto de filtro de pliegues para eliminar las impurezas insolubles. A continuación, se preparó una solución acuosa a partir de la anterior, estableciendo un 8% de etanol y se fijó el pH a 3,5 con una concentración final de 15 mM de tampón acético-acetato. *Aquilea Resveratrol* (Laboratorios Uriach). El polvo del interior de las cápsulas se disolvió en etanol y la suspensión correspondiente se filtró en un filtro de pliegues para eliminar los compuestos que quedaban sin disolver. A continuación, se preparó una solución acuosa a partir de la anterior, asegurando un 8% de etanol y modificando el pH a 3,5 con una concentración final de 15 mM de tampón acético-acetato. En otro caso, el polvo contenido en el interior de la cápsula de resveratrol se disolvió en 50 mL de etanol y se sonicó durante 30 min. Transcurrido este tiempo, la suspensión se fue filtrada. Posteriormente, se preparó una dilución (1:25) fijando el contenido de etanol al 30% (v/v) para determinar el contenido de resveratrol en la muestra.

Análisis de quercetina

▪ Suplemento nutraceutico. *Aquilea Resveratrol* (Laboratorios Uriach). El contenido en polvo de la cápsula se disolvió en etanol y se sonicó durante 30 min. Transcurrido este tiempo, la suspensión se filtró en un embudo alemán provisto con un filtro de pliegues. Posteriormente, se preparó una dilución (1:25) fijando etanol al 30% (v/v) para determinar el contenido de quercetina en la muestra.

Análisis de catequina

▪ Almendras de cacao. Los granos de cacao se trituraron con un mortero hasta obtener un polvo uniforme. Una porción de dicho polvo (0,5 g) se suspendió en 5 mL de una mezcla de etanol: agua (30:70, v/v), se sonicó durante 15 min y posteriormente se filtró a través de una membrana de celulosa. El residuo de cacao restante se trató de nuevo con 2 mL de la mezcla extractante; la suspensión se sonicó y se filtró de nuevo repitiendo este proceso hasta que no se detectó más catequina en el extracto. En otro caso, la mezcla de extractante utilizada fue al 50% etanol: agua,

después se sonicó la muestra durante 20 min y, finalmente, se filtró la suspensión para ser analizada.

- Muestra de té. Se añadieron diferentes concentraciones de catequina a una bebida de té verde ya preparada. Esta muestra previamente se diluyó (1:2) con agua desionizada. Seguidamente, 5 mL de la muestra enriquecida se extrajeron con 2 mL de éter etílico para eliminar algunos aditivos alimentarios desconocidos. Este proceso se repitió tres veces. Finalmente, las muestras acuosas se sometieron a la metodología fluorométrica para determinar su contenido de catequina.

- Vino tinto. Las muestras de vino tinto diluidas en una proporción (1:3) fueron enriquecidas con catequina a diferentes concentraciones. A continuación, 5 mL de las muestras enriquecidas se trataron con 2 mL de acetato de etilo para eliminar algunos aditivos alimentarios desconocidos. Este proceso se repitió tres veces. Finalmente, las muestras acuosas se sometieron al proceso analítico para la cuantificación de la catequina.

Análisis de vitaminas (riboflavina, piridoxina y ácido ascórbico)

- Suplementos nutracéuticos. *Vitax* (Laboratorios Ferquisa, S.A.). Las píldoras de *Vitax* se trituraron y la porción apropiada (1,2 g) se disolvió en 100 mL de una mezcla de etanol: agua (30%, v/v). A continuación, la muestra se homogeneizó en vórtex, se sonicó durante 1 h y, finalmente, se filtró a través de un filtro de pliegues. Fue necesario realizar diferentes diluciones en la mezcla de etanol: agua en función del analito a cuantificar. *BCAA powder red berries* (Weider Nutrition, S.L.). Una porción adecuada de la muestra en polvo (3,85 g) se disolvió en 25 mL de una mezcla extractante compuesta por etanol: agua (30%, v/v). La solución se agitó en vórtex durante unos segundos, se sonicó durante 15 min y finalmente se filtró. Se prepararon diluciones adecuadas en la mezcla de etanol: agua para analizar los diferentes compuestos.

II.2. Dispositivos y equipos de laboratorio

A continuación, se enumeran y detallan todos los equipos, instrumentación y materiales empleados en el desarrollo de las investigaciones aportadas en esta Tesis

Doctoral, tanto para la caracterización fisicoquímica de los materiales sintetizados como para el desarrollo de los diferentes métodos analíticos propuestos.

II.2.1. Instrumentación

Espectrofotómetro ultravioleta-visible

Los espectros ultravioleta-visible (UV-Vis) se registraron en un espectrofotómetro Secomam (Uvi Light & Uvikon XS 2, referencia 0M8307) (**Figura II.1**) en el rango de barrido de 190 – 900 nm, utilizando dos tipos de cubetas de cuarzo, una convencional y una microcubeta, ambas de 10 mm de paso óptico. La adquisición de datos se realizó con el software LabPower V3-50.



Figura II.1. Ilustración del espectrofotómetro UV-Vis “Uvi Light & Uvikon XS 2”.

Espectrofluorímetro

Las mediciones de fotoluminiscencia se realizaron con un espectrofluorímetro Photon Technology International (PTI), modelo QuantaMaster™ 40 equipado con una lámpara de xenón de 75 W y un fototubo multiplicador (PTM, modelo 814) como sistema de detección (**Figura II.2**). Se utilizó el software FelixGX de interfaz USB ASOC-10 para la adquisición y el análisis de datos.



Figura II.2. Ilustración del espectrofluorímetro “PTI QuantaMaster™ 40”.

Para determinar el tiempo de vida medio de la emisión fluorescente de las especies, se registraron medidas de decaimiento de la fluorescencia en un fluorímetro PTI Time Master equipado con un láser de nitrógeno de picosegundos y un selector de longitud de onda. El detector estroboscópico se acopló a un monocromador Czerny-Turner en el puerto de emisión.

Sistema de dispersión dinámica de la luz y potencial Z

Las medidas de la distribución del tamaño de las partículas y del potencial zeta se adquirieron con un dispositivo Zetasizer Nano ZS (modelo ZEN3500) de Malvern (**Figura II.3**), utilizando un láser de dispersión de luz dinámica (DLS) y analizando los movimientos brownianos de las partículas en el medio y una unidad de dispersión de luz electroforética (EIS), respectivamente. El análisis de datos fue llevado a cabo utilizando el software Zetasizer.



Figura II.3. Ilustración del dispositivo Zetasizer Nano ZS “ZEN3500”.

Espectrómetro Raman

Las mediciones Raman se realizaron utilizando un espectrómetro Raman portátil modelo B&W Tek, conocido como i-Raman BWS415, con una longitud de onda de excitación de 785 nm (**Figura II.4**). La potencia máxima de salida del láser fue de 285 mW en la muestra. Los espectros Raman se adquirieron mediante un detector de carga acoplada (CCD, $12 \mu\text{m} \cdot 12 \mu\text{m}$ de tamaño de píxel, 2048 píxeles) refrigerado a $10 \text{ }^\circ\text{C}$. Los espectros Raman se midieron en el rango de detección de $100 - 3000 \text{ cm}^{-1}$ utilizando un sistema de lentes de aumento entre 10 y 100x. La adquisición y el procesamiento de los datos, así como el control del instrumento, se llevaron a cabo con el software BWSpecTM.

El microscopio Raman BAC151B utilizado es compatible con los sistemas Raman de B&W Tek con los que se acopla. La cámara integrada permite un muestreo Raman de precisión a través de la monitorización por cámara del rayo láser y de los detalles de la imagen.



Figura II.4. Ilustración del espectrómetro Raman portátil “B&W Tek (i-Raman BWS415)” acoplado al microscopio “BAC151B”.

También se utilizó un microscopio confocal Raman Renishaw InVia (**Figura II.5**). Las mediciones se realizaron en el rango de detección de $1000 - 2000 \text{ cm}^{-1}$ con una longitud de onda de excitación de 532 nm , un láser de 1% de potencia y un aumento de $50\times$.



Figura II.5. Ilustración del espectrómetro Raman confocal “Renishaw InVia”.

Espectrómetro infrarrojo por transformada de Fourier

La caracterización de los nanomateriales mediante espectroscopía infrarroja se realizó en un espectrómetro infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR) Shimadzu modelo IRAffinity-1S, con un cristal de reflectancia total atenuada (ATR) de ZnSe y un detector estándar de sulfato de triglicina deuterado (DTGS) (**Figura II.6**).



Figura II.6. Ilustración del espectroscopio FT-IR “IRAffinity-1S”.

Microscopio de fuerza atómica

También se estudió la topografía superficial de los nanomateriales mediante un microscopio de fuerza atómica (AFM) utilizando un modelo NT-MDT Solver (Figura II.7). Las muestras se depositaron en una fina placa de mica.



Figura II.7. Ilustración del microscopio de fuerza atómica “NT-MDT Solver”.

Analizador termogravimétrico

Se han realizado análisis de calorimetría diferencial de barrido (DSC) para caracterizar procesos como la fusión o la cristalización. Además, se han realizado análisis termogravimétricos (TGA) para comprobar la pérdida de masa de un compuesto al variar la temperatura aplicada. Para ello, se utilizó un equipo SDT Q600 (Figura II.8) que mide simultáneamente el flujo de calor y la variación de peso de un material en función de la temperatura bajo una atmósfera controlada.



Figura II.8. Ilustración del analizador térmico simultáneo DSC-TGA "SDT Q600".

Sistema de electroforesis capilar

Para realizar todos los análisis electroforéticos se utilizó el equipo de electroforesis capilar (CE) Agilent, modelo G1600AX, equipado con un detector de diodo array (DAD) (**Figura II.9**). El equipo está conectado a un ordenador para el control y el procesamiento de los datos, que se realizaron a través del software Agilent ChemStation.



Figura II.9. Ilustración del sistema de electroforesis capilar "Agilent G1600AX".

Microscopio electrónico de barrido

Se utilizó un equipo de microscopía electrónica de barrido de alta resolución (HR-SEM) para caracterizar la morfología de los materiales. El modelo ZEISS GeminiSEM 500 (**Figura II.10**) funciona con un voltaje de aceleración de 0,02 – 30 kV, una corriente de sondeo de 3 pA – 20 nA, una resolución de almacenamiento de hasta 32 k · 24 k píxeles y un aumento de 50 a $2 \cdot 10^6$. Está equipado con varios

detectores: detector de electrones secundarios en la lente, detector de retrodispersión de energía seleccionada en la lente (EsB), detector STEM anular (aSTEM) y detector de difracción de retrodispersión de electrones (EBSD) para investigar la orientación cristalina. Con este equipo también se realizaron análisis de espectroscopía de rayos X de energía dispersiva (EDS). Además, se efectuaron análisis a baja temperatura cuando se trabaja en microscopía electrónica de barrido a temperatura criogénica (cryo-SEM) para realizar imágenes SEM de alta resolución.



Figura II.10. Ilustración del microscopio SEM “ZEISS GeminiSEM 500”.

Microscopio electrónico de transmisión

Las imágenes de microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HR-TEM) se obtuvieron en un instrumento TEM Tecnai F30 FEG equipado con un detector de deriva X-MAX Si sin ventana, utilizando 300 kV de voltaje (**Figura II.11**). Las muestras previamente preparadas se depositaron sobre una rejilla de cobre recubierta con carbono.



Figura II.11. Ilustración del microscopio TEM “Tecnai F30 FEG TEM”.

Difractómetro de rayos X

Las medidas se realizaron utilizando un difractómetro de rayos X (XRD) de marca Philips Panalytical y modelo X’Pert MPD (**Figura II.12**). Los experimentos fueron realizados a 40 mA y 40 kV con radiación Cu K α 1 (1.54056 Å), rendija de divergencia automática, monocromador de grafito y detector proporcional sellado de gas xenón. El rango de difracción 2θ utilizado fue entre 5 y 50°. Los datos fueron adquiridos con un paso angular de 0,013° y a 1 s por paso.



Figura II.12. Ilustración del difractómetro de rayos X “Philips X’Pert MPD”.

II.2.2. Otros instrumentos, aparatos y materiales

II.2.2.1. Otros instrumentos

- Balanza analítica modelo AE240 (Mettler, Toledo, España).
- pH-metro modelo Crison Basic 20 combinado con un electrodo de vidrio (Allela, Barcelona, España).

II.2.2.2. Aparatos

- Baño de ultrasonidos de 50 W y 60 Hz (J. P. Selecta, Barcelona, España).
- Microcentrífuga Biosan Microspin 12 (LabNet Biotecnica S. L., Madrid, España).
- Agitador magnético digital serie H03D, con calefacción y placa revestida de cerámica (Labbox Instruments, Barcelona, España).
- Agitador vortex serie V05, con control de velocidad (Labbox Instruments, Barcelona, España).
- Incubador de CO₂ HEPA, clase 100 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EE.UU.).
- Lámpara UV, modelo E2107, de 230 V y longitud de onda de 254/365 nm (Consort BVBA, Turnhout, Bélgica).
- Lámpara IR, modelo Theratherm Deluxe Par38, de 150 W y 230 V (Osram, Madrid, España).
- Liofilizador LyoQuest (Telstar, Barcelona, España).
- Bomba de vacío (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EE.UU.).

II.2.2.3. Materiales

- (Micro)pipetas.
- Material de vidrio de laboratorio, clase A.
- Capilar de sílice fundida de 75 μm de diámetro interior y 365 μm de diámetro exterior (Polymicro Technologies, Phoenix, Arizona, EE.UU.).
- Viales de electroforesis capilar (Agilent, Madrid, España).
- Plataformas de CaF₂ (Crystran, Poole, UK).
- Obleas de Si/SiO₂ (Pure Wafer, San Jose, California, EE.UU.).

- Frascos de vidrio y polipropileno.
- Viales Eppendorf.
- Pipetas de vidrio y plástico.
- Jeringas y agujas.
- Filtros de jeringa de nylon con tamaño de poro de 0,22 y 0,45 μm (Millipore, Madrid, España).
- Microjeringa Hamilton 250 (Análisis Vínicos S. L., Ciudad Real, España).
- Tubos para diálisis (Fisher Scientific, Madrid, España)
- Tubos de ensayo.
- Cuvetas de cuarzo (Hellma Analytics, Jena, Alemania).

II.3. Métodos de síntesis de nanomateriales y otros procedimientos utilizados

En este apartado se describen las metodologías y procedimientos más relevantes utilizados durante el trabajo experimental de la presente Tesis Doctoral.

II.3.1. Síntesis y funcionalización de nanomateriales

Síntesis de nanopartículas de oro estabilizadas citrato

Se sintetizaron AuNPs de diferentes tamaños y forma cuasi-esférica empleando una técnica de nucleación y crecimiento previamente descrita,¹ aunque con ligeras modificaciones (**Figura II.13**).

Esta técnica se basa en el método de Turkevich-Frens y consiste en sintetizar semillas (núcleos) de AuNPs e ir añadiendo diferentes cantidades de oro para aumentar su tamaño hasta conseguir el deseado.

Para ello, una disolución de 50 mL de citrato de sodio (Na_3Ct) 2,2 mM se calentó a reflujo. A continuación, a la solución anterior se añadió una alícuota de 333 μL de HAuCl_4 25 mM. Este proceso de formación de semillas, llamado t_0 , necesita un tiempo de reacción de 30 min bajo agitación vigorosa. Transcurrido ese tiempo, la temperatura del proceso se redujo a 90 °C y se añadió otra alícuota de 333 μL de HAuCl_4 25 mM al matraz para continuar la reacción durante otros 30 min. El

producto obtenido en esta etapa del proceso se denominó c_0+1Au . El procedimiento se repitió una vez más con otra adición de 333 μL de HAuCl_4 25 mM, dando a la reacción 30 min más. El producto obtenido se denominó c_0+2Au , por las dos adicciones de oro que se añadieron desde la formación de los núcleos. Una vez alcanzada esta etapa, se extrajo una parte de las AuNPs obtenidas, dejando aproximadamente 18,3 mL del producto en el matraz. El producto extraído se dejó enfriar a temperatura ambiente y se almacenó a 4 °C en un vial opaco para evitar alteraciones debidas a la luz.

Una vez extraído el producto, se añadieron al matraz aproximadamente 17,6 mL de agua desionizada y una alícuota de 666 μL de una disolución de Na_3Cit 60 mM y la mezcla resultante se mantuvo en agitación durante 15 min para su completa homogeneización. Esta etapa de dilución del producto por adición de agua y citrato se denominó c_0+2Au *diluido*. Se repitieron los procesos de adición de la disolución de HAuCl_4 25 mM para obtener los productos c_1 , c_1+1Au y c_1+2Au . El proceso continuó cíclicamente hasta obtener el crecimiento c_4+2Au según se esquematiza en la **Figura II.14**.

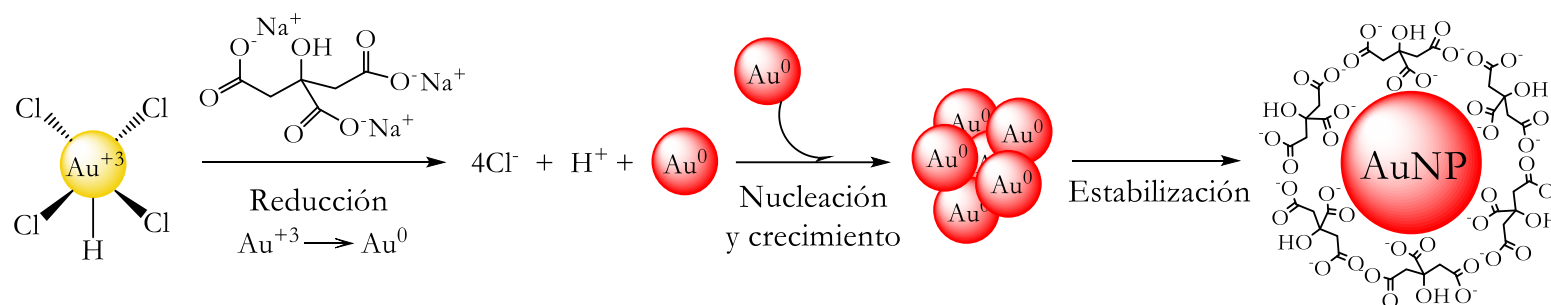


Figura II.13. Técnica de nucleación y crecimiento basada en el método Turkevich-Frens.

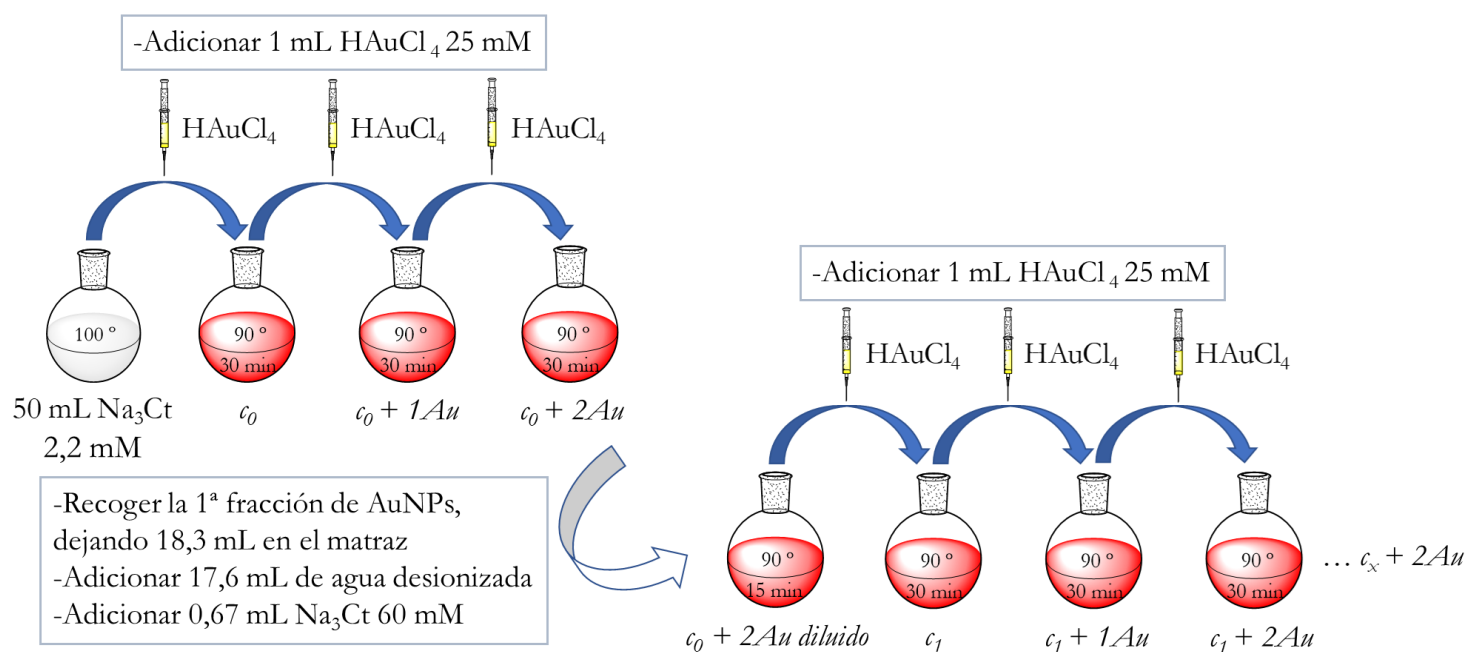


Figura II.14. Ilustración del proceso de síntesis de las AuNPs de diferentes tamaños.

Síntesis de puntos cuánticos de grafeno carboxilados

Los puntos cuánticos de grafeno carboxilados (c-GQDs) se prepararon por tratamiento en medio ácido empleando ácido úrico como precursor único, según una metodología *bottom-up* previamente descrita² con ligeras modificaciones (**Figura II.15**). En un matraz con forma de corazón se añadieron 0,5 g de ácido úrico y 1 mL de ácido sulfúrico. La mezcla se dejó reaccionar durante 1 h bajo agitación continua a 200 °C en un baño de aceite. El producto de reacción resultante, de color pardo, se enfrió a temperatura ambiente, seguidamente se diluyó hasta 150 mL con agua desionizada y finalmente se neutralizó con NaOH. La suspensión se trató con 25 mL de una mezcla metanol:acetona (1:4, v/v), y se agitó durante 5 min. Posteriormente, la suspensión se filtró a través de una membrana de nylon de 0,45 μm en un sistema Millipore para separar las partículas de gran tamaño precipitadas. Este proceso de purificación se repitió varias veces hasta que el filtro quedó completamente limpio. Seguidamente, el disolvente orgánico de la solución de color amarillenta de GQDs se evaporó a presión reducida. Finalmente, la disolución resultante se sometió a un proceso de diálisis durante aproximadamente 72h utilizando una membrana semipermeable de celulosa. La estructura nanométrica obtenida mostró una intensa fluorescencia de color azul al ser irradiada bajo luz UV a 365 nm.

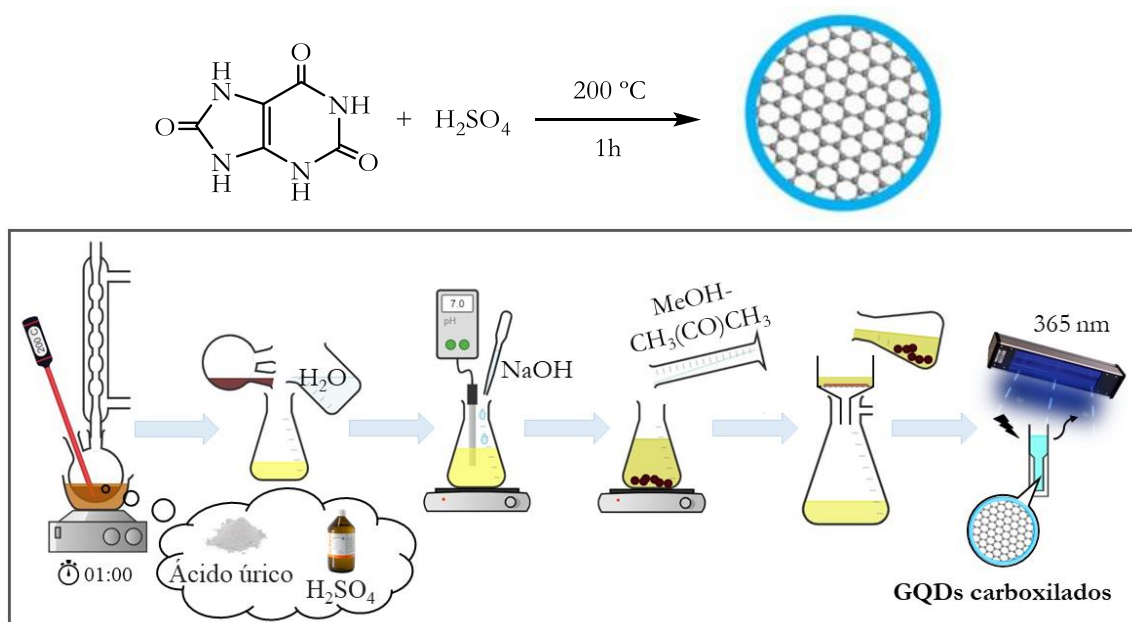


Figura II.15. Esquema de síntesis de los c-GQDs preparados a partir de ácido úrico en medio ácido.

Síntesis de puntos cuánticos de grafeno funcionalizados con carboximetil- β -ciclodextrinas

A partir de los GQDs previamente sintetizados (c-GQDs), se realizó una modificación de éstos mediante su funcionalización con receptores macrocíclicos del tipo cavitando, concretamente β -ciclodextrinas (β cd-GQDs) (**Figura II.16**). Para ello, se siguió un procedimiento previamente descrito para la funcionalización de puntos cuánticos de carbono, pero ligeramente modificado.³ Dicha funcionalización implica dos etapas, la primera de ellas se basa en la reacción de los grupos carboxilo presentes en la superficie de las láminas del nanomaterial con *N*-tert-butoxicarbonil-etilendiamina (Boc-EDA) y, tras la desprotección de las aminas protegidas con Boc, la segunda etapa consiste en la unión de las ciclodextrinas mediante reacciones de acoplamiento de amidas. La funcionalización de los GQDs con Boc-EDA se realizó empleando *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (DIC) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS) como agentes de acoplamiento.⁴ Así, a un matraz de dos bocas de 50 mL que contenía 57,5 mg de NHS (0,50 mmol), se añadieron 77 μ L de DIC (0,50 mmol) y 11 mL de los c-GQDs previamente preparados (0,9 mg mL⁻¹) bajo atmósfera de argón. La mezcla se agitó bajo dicha atmósfera inerte durante 15 min. Por otro lado, se mezclaron 80 μ L de Boc-EDA (0,51 mmol) y 5 μ L de trietilamina (TEA, 0,04 mmol) en un vial durante 10 min y después se añadieron a la disolución anterior de GQDs activados. La solución resultante se agitó durante 20 h a temperatura ambiente bajo condiciones atmosféricas de argón. Una vez transcurrida la reacción, la suspensión se filtró empleando una membrana de nylon de 0,45 μ m en un sistema Millipore para eliminar la carbamida formada como subproducto de reacción (insoluble en agua). La disolución de GQDs modificados con Boc-EDA se calentó a 100 °C durante 15 min para desproteger las aminas, liberándose así el grupo lábil Boc al medio. El producto resultante se purificó por extracción líquido-líquido tres veces con acetato de etilo (GQDs aminados, a-GQDs). El acoplamiento de los cavitandos ciclodextrina a la superficie de los GQDs se consiguió mezclando la disolución que contenía los a-GQDs y 5 μ L de TEA (0,04 mmol) con carboximetil- β -ciclodextrina (CM β -cd, 0,19 mmol) en presencia de DIC (26 mmol) y NHS (0,26 mmol) bajo atmósfera inerte. Tras 7 h de reacción a temperatura ambiente, la suspensión se purificó mediante

filtración y extracción con acetato de etilo tres veces. Finalmente, se evaluó el grado de funcionalización con grupos amino primarios analizando los GQDs carboxilados, protegidos con Boc, aminados y funcionalizados con ciclodextrinas mediante el test de Kaiser.

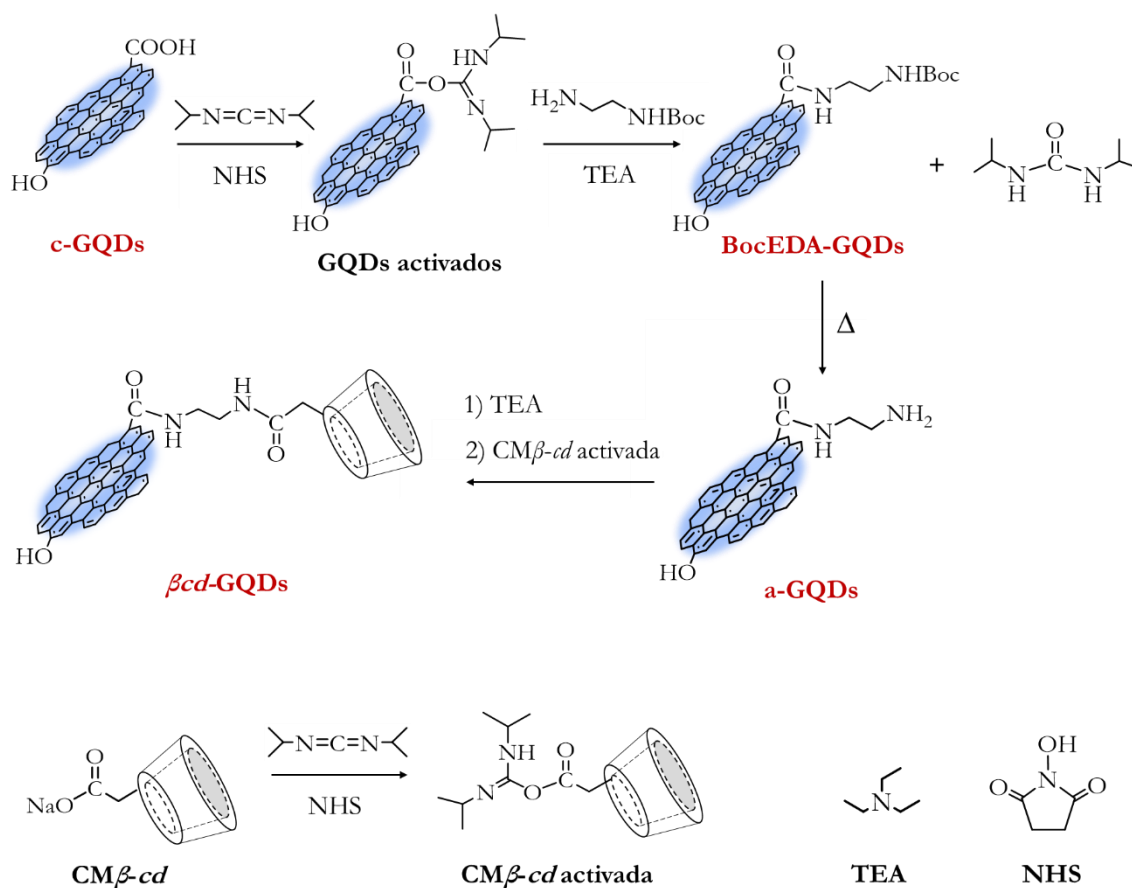


Figura II.16. Esquema de síntesis para la funcionalización de GQDs con β -ciclodextrinas.

Síntesis de nanomicelas de curcumina

Las nanomicelas de curcumina (nanocurcumina) se prepararon a partir de una solución etanólica de curcumina (4 mM) que se añadió gota a gota a 5 mL de solución acuosa de tween 80 para conseguir una concentración final de 1 mM del surfactante ($>$ concentración micelar crítica, CMC) con un 6% de curcumina pura. El tween 80 presenta un contenido $\geq 58,0\%$ de ácido oleico según las especificaciones del fabricante. La nanocurcumina se formó tras agitar vigorosamente en vortex la mezcla durante 10 min a medida que se iba incorporando gota a gota la disolución de curcumina en las ya formadas micelas de tween 80, seguidamente se sonicó la mezcla durante 5 min (**Figura II.17**). La incorporación del bioactivo al componente micelar

se realizó a temperatura ambiente y su cantidad dependerá de la pureza del reactivo. Las disoluciones se mantuvieron protegidas de la luz. La curcumina no encapsulada en las micelas se separó de las micelas cargadas de curcumina tras filtrar la disolución previamente obtenida a través de una membrana de nylon de $0,45\ \mu\text{m}$ de tamaño de poro, quedando retenida en el filtro la curcumina libre (**Figura II.17a, b**). La concentración de nanocurcumina en cada disolución filtrada se recalculó considerando la curcumina no encapsulada en las micelas (curcumina libre). La curcumina libre fue extraída del filtro con metanol y se calculó su concentración midiendo espectrofotométricamente a $425\ \text{nm}$.⁵

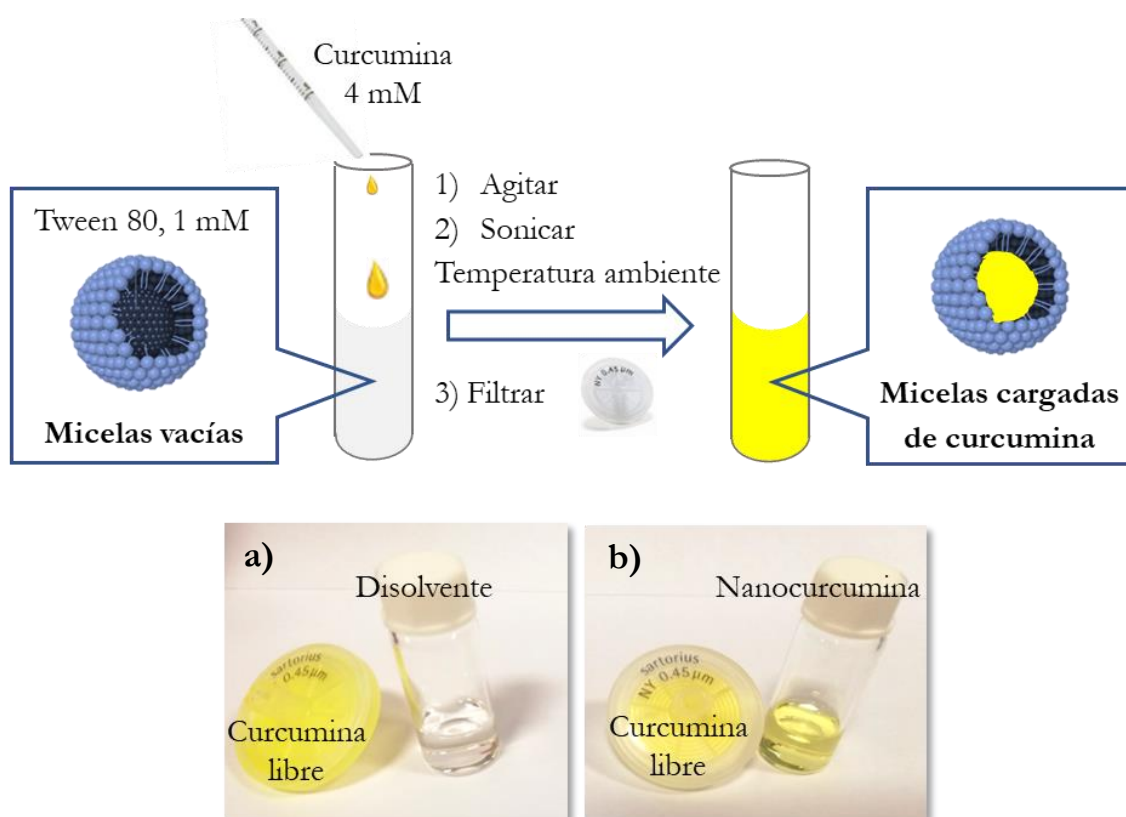


Figura II.17. Ilustración del proceso de preparación de las nanomicelas cargadas de curcumina. Separación de curcumina libre de la encapsulada mediante una membrana de nylon, (a) disolución etanólica de curcumina donde la curcumina queda totalmente retenida en el filtro y sólo pasa el disolvente a través de éste, (b) disolución de nanocurcumina obtenida en el proceso de síntesis donde también existe curcumina no encapsulada la cual queda retenida en la membrana mientras que la curcumina encapsulada es capaz de atravesarlo.

El mismo proceso se llevó a cabo para la preparación de las nanomicelas de demetoxicurcumina (curcumina II) y bisdemetoxicurcumina (curcumina III) (**Figura II.18**).

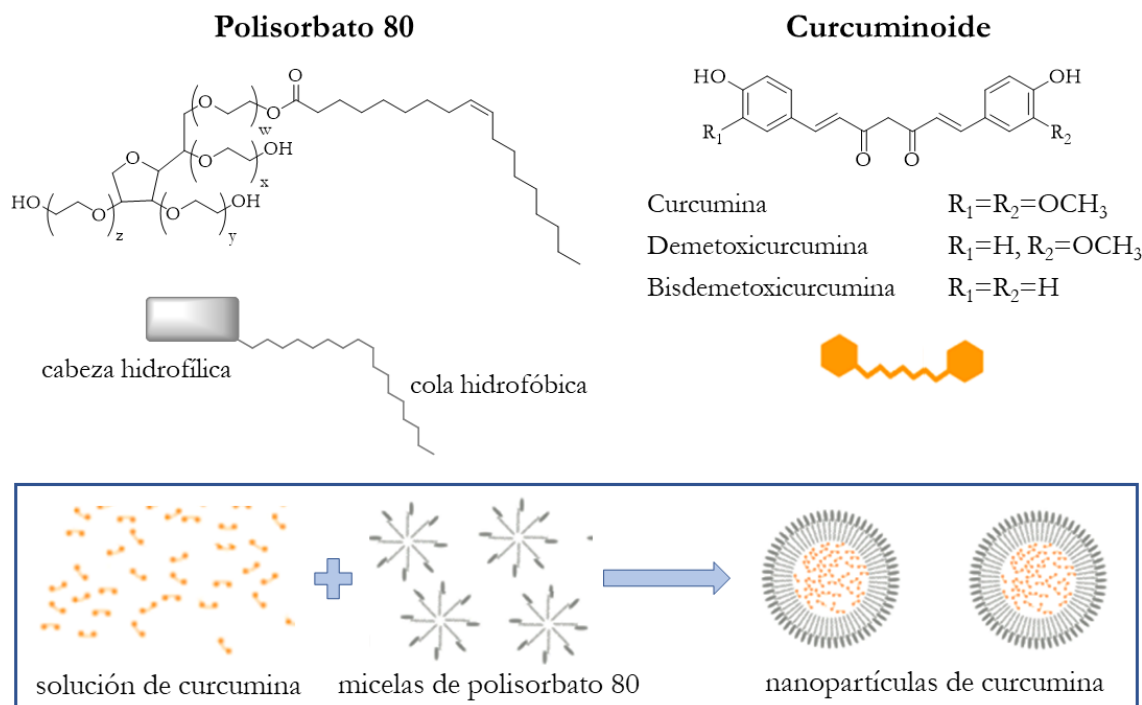


Figura II.18. Esquema de síntesis de nanopartículas de curcumina(oide) recubiertas de polisorbato, en el que una disolución de micelar de polisorbato 80 mezclada con otra de curcumina(oide) hace que las moléculas bioactivas presenten gran afinidad por el núcleo hidrofóbico de las micelas de surfactante, quedando así encapsuladas en su interior. Figura adaptada de [6]. Copyright © 2018, American Chemical Society.

Síntesis de materiales basados en óxido de grafeno

Se sintetizaron tres estructuras basadas en GO con dimensiones laterales y espesores controlados, denominadas óxido de grafeno grande (lGO), óxido de grafeno pequeño (sGO) y óxido de grafeno monocapa (mlGO) (**Figura II.19**).

La primera de las estructuras (lGO) se obtuvo siguiendo un procedimiento experimental previamente descrito en bibliografía.⁷ En este caso, el protocolo de síntesis siguió una metodología de Hummers modificada. Para ello, se preparó una mezcla que contenía 0,8 g de grafito en polvo y 0,4 g de nitrato de sodio en un matraz de fondo redondo, colocado sobre un baño de hielo, y se mantuvo en agitación magnética. Se añaden gradualmente a la mezcla 18,4 mL de ácido sulfúrico comercial

mientras se aumentaba ligeramente la velocidad de agitación. Después de dejar la mezcla en agitación durante 10 min, se añaden muy lentamente 2,4 g de permanganato de potásico. El baño de hielo se reemplaza por un baño de agua, permitiendo que la temperatura de la reacción aumente gradualmente con el tiempo. Después de 30 min, la mezcla es más homogénea convirtiéndose en una pasta espesa de color verde oscuro a la que se le añaden 37,5 mL de agua no pirogénica muy lentamente, gota a gota. Durante este procedimiento se observa una violenta efervescencia púrpura como resultado de la reacción entre el agua y la mezcla ácida, seguida de un gran aumento de la temperatura. Posteriormente, el baño de agua se reemplaza por un baño de aceite precalentado a 80 °C – 90 °C, de modo que la temperatura de reacción pueda estabilizarse en torno a 98 °C, sin exceder los 100 °C, controlándose con una sonda de temperatura. La mezcla resultante se mantiene en agitación durante 30 min comenzando a mostrar una apariencia pastosa más espesa y de color marrón oscuro/verdoso, lo que indica la oxidación del grafito.

A continuación, se añaden 112,5 mL de agua no pirogénica templada ($T^a \sim 50$ °C) seguidos de 12,5 mL de peróxido de hidrógeno al 30% para detener la reacción, reduciendo el permanganato residual (KMnO_4), el dióxido de manganeso (MnO_2) y heptóxido de dimanganeso (Mn_2O_7) a sales solubles de sulfato de manganeso (MnSO_4). Como resultado de la liberación de dióxido de carbono se puede observar efervescencia, indicando el fin de la reacción. El producto resultante se protege de la luz y se deja reposar durante 1 h.

Transcurrido este tiempo, la dispersión se homogeneiza tras agitación durante unos segundos a máxima velocidad y se centrifuga durante 20 min. Se descarta el sobrenadante, pero se mide su pH. Posteriormente, el sedimento de grafito se vuelve a dispersar en agua no pirogénica y las etapas de centrifugación se repiten varias veces (normalmente unos 6 ciclos) hasta que obtener un pH neutro en el sobrenadante. Esto también se caracteriza por la formación de una capa anaranjada similar a un gel en la interfaz entre el sedimento y el sobrenadante. Los detalles sobre las condiciones de temperatura de los diferentes ciclos de centrifuga, así como el tiempo de duración de la agitación en vórtex se encuentran recogidos en bibliografía.⁷ La exfoliación mecánica del GO se realiza agitando en vórtex durante 5 min a máxima velocidad,

seguido de centrifugación, lo que conduce a la acumulación de finas escamas de GO sobre los desechos de grafito negro.

La capa gelatinosa anaranjada de GO se solubiliza en agua tibia y se recoge cuidadosamente evitando volver a mezclarla con el sedimento. Finalmente, se obtiene una solución acuosa de color pardo que contiene escamas grandes de GO altamente dispersables (lGO). Al día siguiente, las impurezas gráficas restantes se eliminan tras dos últimos ciclos de purificación por centrifugación.

A partir de la dispersión de lGO y al someterse a 5 min de sonicación se producen pequeñas escamas de GO (sGO). A continuación, la dispersión se centrifuga durante 5 min para eliminar las escamas de lGO restantes. Esta metodología fue reportada por F. Rodrigues y col.⁸ Este estudio demostró la posibilidad de obtener escamas de GO más pequeñas con características fisicoquímicas similares a las del lGO, que sólo difieren en sus dimensiones laterales.

Por último, se recogen escamas de GO monocapa (mlGO) de la fracción de lavado (pH neutro) previa a la purificación de lGO.⁹ Las concentraciones obtenidas para cada una de las estructuras fueron 2,83; 2,50 y 0,45 mg mL⁻¹ de lGO, sGO y mlGO, respectivamente. Tras su síntesis, las soluciones de GO se congelan con nitrógeno líquido a - 77 K y se subliman a 0,005 mbar durante 3 días.

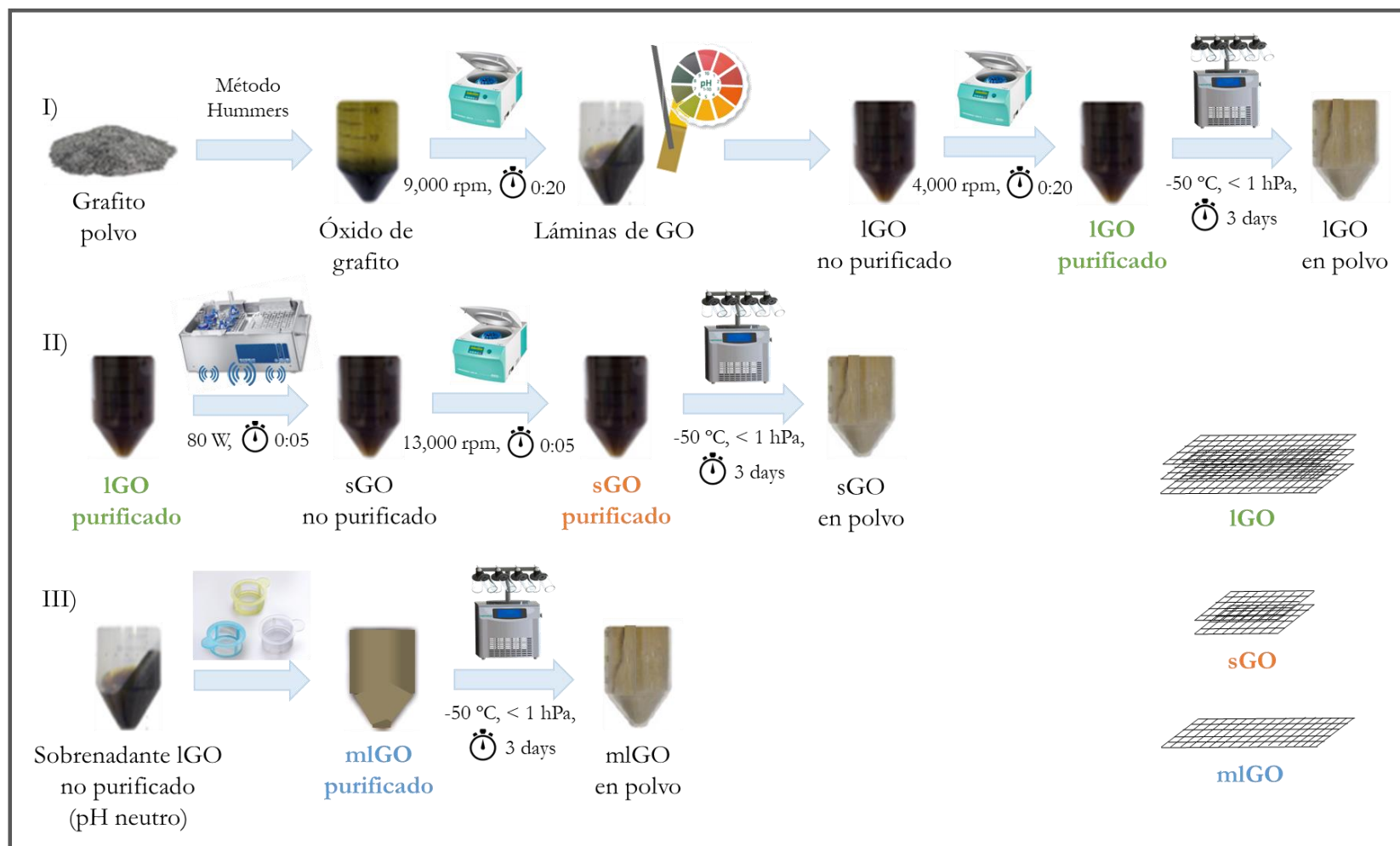


Figura II.19. Ilustración del proceso de síntesis de GO (lGO, sGO y mlGO) siguiendo un método de Hummers modificado a partir de grafito en polvo.

II.3.2. Otros procedimientos utilizados

Procedimiento para evaluar la presencia de aminas primarias: test de Kaiser

El test de Kaiser se trata de un ensayo colorimétrico en el que se produce un color azul oscuro por reacción de ninhidrina con las aminas primarias libres presentes en el material a analizar (**Figura II.20**).¹⁰ Es importante destacar que la prueba no produce el típico color azul oscuro con aminas de mayor grado de sustitución sino que se mantiene el color propio que presente la disolución. El test de Kaiser puede utilizarse para controlar la presencia de aminas libres después de procedimientos de desprotección (color azul oscuro) y la integridad de la reacción de acoplamiento (sin color). La prueba se aplica rutinariamente tanto de forma cualitativa como cuantitativa.



Figura II.20. Ilustración del ensayo de Kaiser para el análisis de aminas primarias en una muestra. Izquierda: disolución de control (incoloro), derecha: disolución con resultado positivo en aminas primarias (azul oscuro).

El procedimiento para llevar a cabo el test de Kaiser es el que se detalla a continuación (**Figura II.21**). Se transfieren 2 – 5 mg o 100 μL del material a analizar a tubos de ensayo, al menos por triplicado, y se mezclan con 75 μL de disolución de fenol en etanol al 80% (reactivo 1), 100 μL de disolución de cianuro de potasio en H_2O /piridina (reactivo 2) y 75 μL de disolución de ninhidrina en etanol al 6% (reactivo 3). Seguidamente, se homogeniza bien la mezcla y se calientan los tubos de ensayo en un baño de agua a 100 $^\circ\text{C}$ durante unos 7 min. Inmediatamente después, se retiran los tubos de ensayo del baño de calor y se le añaden en torno a 5 mL de una disolución etanólica al 60%. Finalmente, se homogeniza de nuevo la disolución y se mide su absorbancia a 570 nm. Es importante realizar este proceso lo más rápidamente posible, ya que cuando la solución se enfría la coloración desaparece. El

volumen a añadir de la mezcla etanólica va a depender de la intensidad de la coloración de la disolución para poder ser medida espectrofotométricamente, por lo que, si fuese necesario, se diluiría la muestra.

A su vez, medir la disolución acuosa al 60% de etanol como blanco repitiendo el mismo proceso para así poder comparar las muestras.

El contenido de aminas primarias presentes en una muestra se puede calcular a partir de la siguiente ecuación (ecuación 1):

$$[\text{aminas primarias}] (\mu\text{mol g}^{-1}) = \frac{A^{570} \cdot V_f (\text{L}) \cdot 10^6}{15000 (\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}) \cdot 1 \text{ cm} \cdot W (\text{g})} \quad \text{Ec (1)}$$

donde A^{570} corresponde a la absorbancia a 570 nm, V_f es el volumen final de muestra y W es la masa de material. Los valores se expresan como μmoles de aminas primarias por gramo de material.

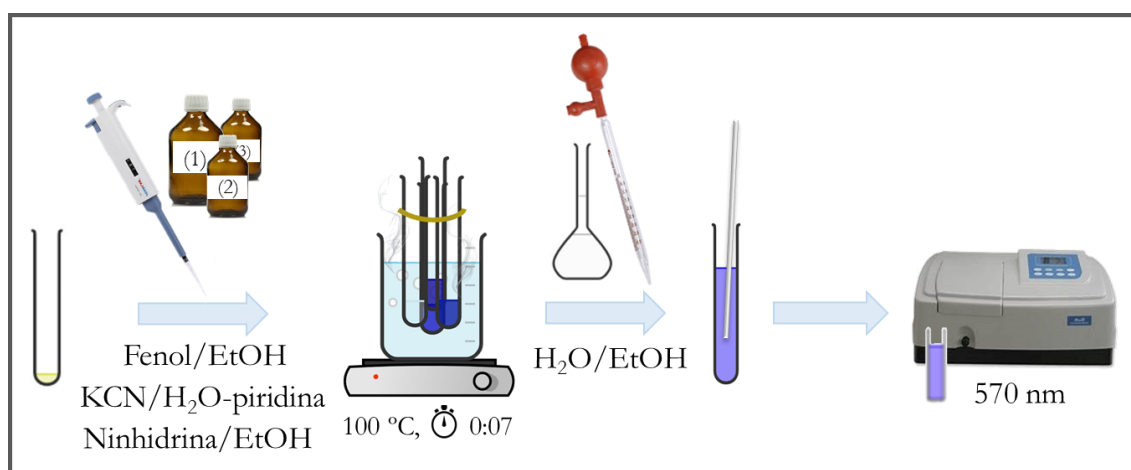


Figura II.21. Ilustración del proceso de análisis de una muestra para la detección y/o cuantificación de aminas primarias empleando el test de Kaiser.

Procedimiento para evaluar la capacidad antioxidante: ensayo ABTS

El procedimiento ABTS se utiliza para evaluar la capacidad antioxidante total de una muestra. Este ensayo fue propuesto por primera vez por Miller y col. en 1993¹¹ y está basado en la inhibición de la absorbancia del catión radical de ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) por parte de especies antioxidantes.

El método actual utilizado para la generación del radical catiónico ABTS (cromóforo verde-azulado) implica la reacción directa entre ABTS y persulfato de potasio. Este cromóforo posee tres máximos de absorción a longitudes de onda de 645, 734 y 815 nm. La adición de antioxidantes al radical previamente formado sigue un mecanismo de transferencia de electrones, que se visualiza como una decoloración de la especie radicalaria indicando su reducción (**Figura II.22**).¹² De esta forma, el grado de decoloración permite evaluar el porcentaje de inhibición del radical catiónico ABTS, que se determina en función de la concentración de antioxidante y del tiempo de reacción. Generalmente se monitoriza el máximo de absorción a 734 nm por razones de sensibilidad. Trolox es un fenol simple análogo a la vitamina E que se utiliza como antioxidante de referencia (**Figura II.23**). El radical posee solubilidad en medios polares y apolares y no es afectado por la fuerza iónica; por tanto, este método es aplicable para el estudio de antioxidantes liposolubles e hidrosolubles.¹³

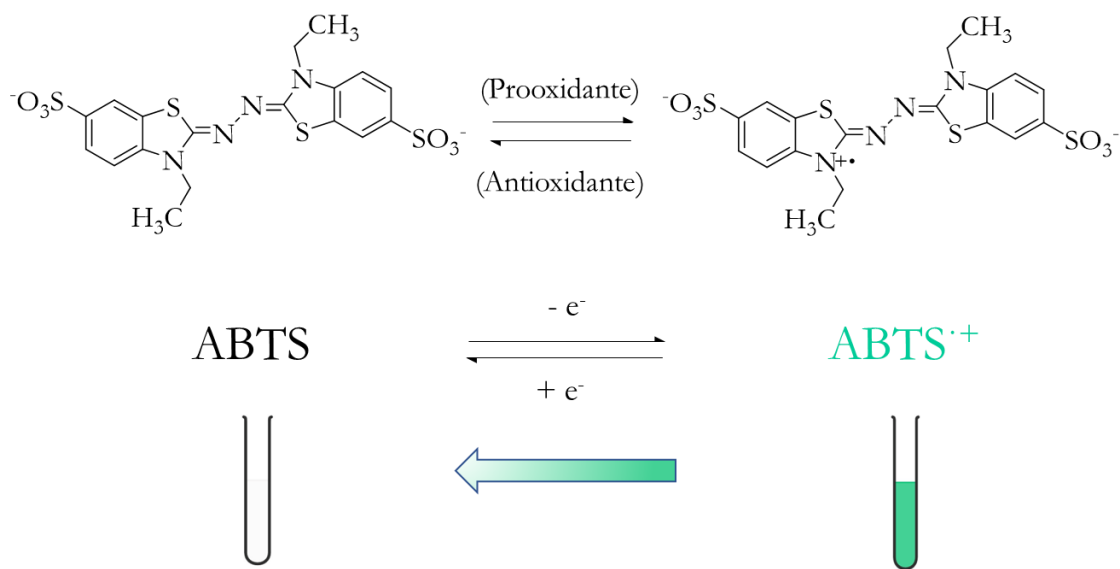


Figura II.22. Principio del ensayo de capacidad antioxidante mediante ABTS.

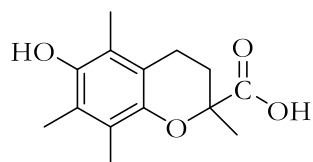


Figura II.23. Estructura de la molécula de Trolox.

A continuación, se detalla el protocolo de análisis. Para la generación del radical catiónico ABTS, se hace reaccionar la sal ABTS con persulfato de potasio. Para ello,

por un lado, se disuelven 0.384 g de la sal en 90 mL de agua y por otro lado se disuelven 0.066 g de persulfato en 10 mL de agua. Seguidamente, se mezclan las dos disoluciones anteriores para preparar una disolución madre de 7 mM de la sal ABTS y 2,45 mM de persulfato potásico. La mezcla se mantiene en la oscuridad durante 12 – 14 h a temperatura ambiente antes de ser utilizada. La solución de trabajo ABTS⁺ se obtiene diluyendo la disolución madre en etanol (1:90, v/v) para realizar medidas espectrofotométricas, consiguiendo un valor de absorbancia inicial de $0,7 \pm 0,02$ a 734 nm. Se añade una alícuota de 20 μ L de muestra, etanol (blanco) o del estándar (Trolox) a 3 mL de solución de trabajo ABTS⁺ en la oscuridad. La absorbancia a 734 nm se determina inmediatamente después de la adición y mezcla rápida y nuevamente después de 5 min de reacción. Las medidas de absorbancia en $t = 0$ min ($A_t = 0$) y $t = 5$ min ($A_t = 5$) de reacción se utilizan para calcular el porcentaje de inhibición de la absorbancia. A mayor capacidad antioxidante de un extracto, habrá una mayor pérdida de color, proporcional al grado de captura del radical oxidado. Por otro lado, se construye una curva de referencia estándar representando los valores de inhibición de la absorbancia (%) frente a la concentración de Trolox (0,1 – 1,0 mM). El porcentaje de inhibición de la formación del radical catiónico ABTS por efecto del antioxidante añadido se puede cuantificar empleando la ecuación 2. Los resultados se expresan de acuerdo con sus iniciales en inglés como Capacidad Antioxidante en Equivalentes de Trolox (TEAC), correspondiente a mmoles de equivalentes Trolox por masa de extracto, indicando la habilidad de la muestra de atrapar el radical ABTS en relación con una solución estándar de Trolox como compuesto de referencia, todo ello bajo las mismas condiciones experimentales.¹⁴ Cada muestra se analiza tres veces por duplicado de análisis.

$$\text{Inhibición (\%)} = \left[\frac{(A_{\text{muestra } (t=0)} \cdot A_{\text{blanco } (t=5)}) - (A_{\text{muestra } (t=5)} \cdot A_{\text{blanco } (t=0)})}{(A_{\text{muestra } (t=0)} \cdot A_{\text{blanco } (t=0)})} \right] \cdot 100 \quad \text{Ec (2)}$$

Procedimiento para el cálculo del rendimiento cuántico

El rendimiento cuántico fluorescente (Φ_F) se define como la relación entre el número de fotones emitidos por una especie y el número de fotones absorbidos. Experimentalmente, este valor puede calcularse midiendo la fluorescencia de un

fluorocromo de Φ_F conocido utilizando los mismos parámetros experimentales (longitud de onda de excitación, ancho de apertura, fotomultiplicador, voltaje...) que la sustancia a analizar. Este método comparativo de análisis es el más fiable y fue descrito por Williams y col.¹⁵

El procedimiento experimental para llevar a cabo este tipo de análisis se indica a continuación. En primer lugar, se registra el espectro de absorción UV-Vis del disolvente utilizado para la muestra, y seguidamente se registra su espectro fluorescente utilizando como longitud de onda de excitación la obtenida para el máximo de absorción. En el caso de los perfiles de fluorescencia se utilizan las intensidades de fluorescencia integradas (es decir, el área del espectro de fluorescencia). Posteriormente, se preparan al menos cinco disoluciones de concentración creciente tanto de la muestra a analizar como de la referencia. Finalmente, se traza un gráfico en el que se representa la intensidad fluorescente integrada frente a la absorbancia para cada una de las concentraciones preparadas. El resultado de la representación será el de una línea recta de pendiente “ K ” y ordenada en el origen de cero.

Como requisito, deben seleccionarse aquellas muestras de referencia que emitan en un rango que comprenda el máximo de emisión de la muestra a analizar.

El valor del Φ_F de una muestra se calcula a partir de los datos obtenidos previamente y utilizando muestras de referencia (estándar) que tienen un valor de Φ_F fijo y conocido, de acuerdo con la ecuación 3:

$$\Phi_S = \Phi_{ST} \left(\frac{K_S}{K_{ST}} \right) \left(\frac{\eta_S^2}{\eta_{ST}^2} \right) \quad \text{Ec (3)}$$

donde los subíndices S y ST hacen referencia a la muestra y al estándar respectivamente, Φ es el rendimiento cuántico fluorescente, K la pendiente obtenida de la representación de la intensidad de fluorescencia integrada frente a la absorbancia y η el índice de refracción del disolvente. Para minimizar los efectos de reabsorción, la absorbancia se debe registrar por debajo de 0,10 cuando se utiliza una cubeta de 10 mm de paso óptico.

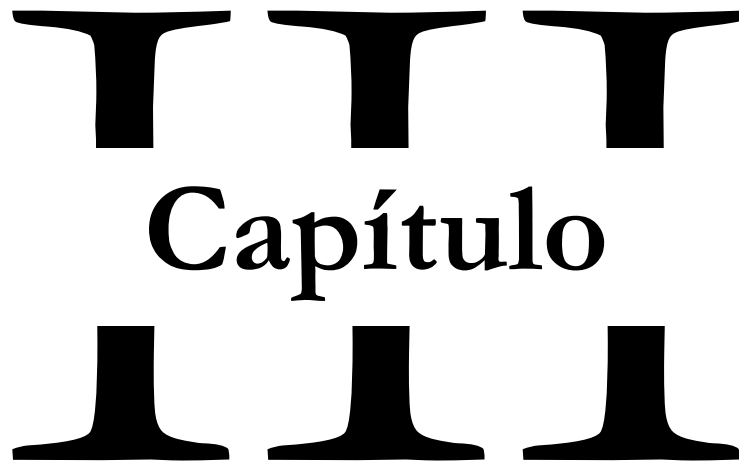
Previamente, dos compuestos estándar se calibran de forma cruzada utilizando la ecuación 3. Esto se logra calculando el Φ_F de cada muestra estándar en relación con la otra. Por ejemplo, si las dos muestras estándar están etiquetadas como A y B, inicialmente A se trata como el estándar (*ST*) y B como la muestra de prueba (*S*), y se utiliza el Φ_F conocido para A. Posteriormente, el proceso se invierte, de modo que B ahora se trata como el estándar (*ST*) y A se convierte en la muestra de prueba (*S*). De esta manera, los Φ_F de A y B se calculan con respecto a B y A respectivamente. Los valores de $\Phi_F(A)$ y $\Phi_F(B)$ obtenidos deben coincidir con los valores descritos en bibliografía. La coincidencia generalmente se considera válida y aceptable si los datos obtenidos presentan una buena linealidad con una intersección en cero y los Φ_F experimentales coinciden en un $\pm 10\%$ con sus equivalentes valores bibliográficos.

Una vez que las muestras estándar se han calibrado de forma cruzada y se ha obtenido una coincidencia aceptable, se pueden calcular los valores de Φ_F para las muestras problema, utilizando la misma ecuación anterior.

Referencias

1. Bastús, N. G.; Comenge, J.; Puentes, V. Kinetically controlled seeded growth synthesis of citrate-stabilized gold nanoparticles of up to 200 nm: size focusing versus Ostwald ripening. *Langmuir* **2011**, *27*(17), 11098-11105.
2. Durán, G. M.; Benavidez, T. E.; Contento, A. M.; Ríos, A.; García, C. D. Analysis of penicillamine using Cu-modified graphene quantum dots synthesized from uric acid as single precursor. *Journal of Pharmaceutical Analysis* **2017**, *7*(5), 324-331.
3. Cayuela, A.; Soriano, M. L.; Valcárcel, M. β -Cyclodextrin functionalized carbon quantum dots as sensors for determination of water-soluble C 60 fullerenes in water. *Analyst* **2016**, *141*(9), 2682-2687.
4. Cayuela, A.; Soriano, M. L.; Valcárcel, M. Reusable sensor based on functionalized carbon dots for the detection of silver nanoparticles in cosmetics via inner filter effect. *Analytica Chimica Acta* **2015**, *872*, 70-76.
5. Mukerjee, A.; Vishwanatha, J. K. Formulation, characterization and evaluation of curcumin-loaded PLGA nanospheres for cancer therapy. *Anticancer Research* **2009**, *29*(10), 3867-3875.
6. Peng, S.; Li, Z.; Zou, L.; Liu, W.; Liu, C.; McClements, D. J. Enhancement of curcumin bioavailability by encapsulation in sophorolipid-coated nanoparticles: an in vitro and in vivo study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2018**, *66*(6), 1488-1497.
7. Jasim, D. A.; Lozano, N.; Kostarelos, K. Synthesis of few-layered, high-purity graphene oxide sheets from different graphite sources for biology. *2D Materials* **2016**, *3*(1), 14006-14022.
8. Rodrigues, A. F.; Newman, L.; Lozano, N.; Mukherjee, S. P.; Fadeel, B.; Bussy, C.; Kostarelos, K. A blueprint for the synthesis and characterisation of thin graphene oxide with controlled lateral dimensions for biomedicine. *2D Materials* **2018**, *5*(3), 35020-35038.
9. Arranz, A. E.; Arranz, M. Á.; Morales, M.; Martín-Folgar, R.; Álvarez-Rodríguez, J. Thickness of graphene oxide-based materials as a control parameter. **2021**.

10. Sarin, V. K.; Kent, S. B.; Tam, J. P.; Merrifield, R. B. Quantitative monitoring of solid-phase peptide synthesis by the ninhydrin reaction. *Analytical Biochemistry* **1981**, *117*(1), 147-157.
11. Miller, N. J.; Rice-Evans, C.; Davies, M. J.; Gopinathan, V.; Milner, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science* **1993**, *84*(4), 407-412.
12. Hernández-Rodríguez, P.; Baquero, L. P.; Larrota, H. R. Flavonoids: potential therapeutic agents by their antioxidant capacity. In *Bioactive Compounds*, Elsevier **2019**, pp 265-288.
13. Shahidi, F.; Zhong, Y. Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods* **2015**, *18*, 757-781.
14. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical Biology and Medicine* **1999**, *26*(9-10), 1231-1237.
15. Williams, A. T. R.; Winfield, S. A.; Miller, J. N. Relative fluorescence quantum yields using a computer-controlled luminescence spectrometer. *Analyst* **1983**, *108*(1290), 1067-1071.



Capítulo

**Puntos cuánticos de grafeno
como herramienta en el
análisis de alimentos**

En este capítulo se ha pretendido contribuir al desarrollo de metodologías analíticas mejoradas mediante la incorporación de nanomateriales que impliquen compuestos bioactivos para ser determinados en matrices de interés alimentario. Por lo tanto, a lo largo de este capítulo se va a abordar principalmente la primera de las perspectivas del desarrollo de la Nanociencia y Nanotecnología Analítica, en la cual los nanomateriales son utilizados como herramienta en alguna de las diferentes etapas del proceso analítico. Concretamente, en este caso su implementación tendrá como principal objetivo la mejora de los procesos de detección o separación instrumental de compuestos biológicamente activos.

En este sentido, los subcapítulos III.1 y III.2 ejemplifican la utilización de nanoestructuras de carbono con diferente funcionalización para el desarrollo de metodologías analíticas con objeto de mejorar la respuesta analítica, ya sea en términos de sensibilidad o selectividad. En el primero de ellos, se propone un método fluorescente asistido por puntos cuánticos de grafeno funcionalizados con grupos amino y carboxilo para la detección del principal ingrediente activo de la cúrcuma, denominado curcumina, mejorando la sensibilidad de su detección. Además, dicho método presenta una elevada selectividad pudiendo diferenciar entre entornos en los cuales se encuentra dicho bioactivo, libre o encapsulado en nanomicelas. La detección de la nanoestructura de curcumina empleando puntos cuánticos de grafeno como sonda fluorescente también implica la implementación de la tercera vía de la Nanociencia y Nanotecnología Analítica, siendo nanomateriales tanto la herramienta analítica implicada en el proceso de detección (puntos cuánticos de grafeno) como el analito a determinar (nanomaterial orgánico nanoestructurado, concretamente nanomicelas de curcumina).

En el segundo subcapítulo, se aborda la detección y determinación conjunta de varios compuestos biológicamente activos comúnmente presentes en alimentos que forman parte de la dieta mediterránea. Para ello, se utiliza un método de separación con electroforesis capilar que implica el uso de nanomateriales para la mejora de la selectividad del mismo. Al igual que en el subcapítulo anterior, el nanomaterial empleado son puntos cuánticos de grafeno, pero en este caso incorporan cavitando ciclodextrinas en su superficie. Dicho nanomaterial se utiliza

como aditivo en el electrolito de separación. El desarrollo de un método analítico de multicomponentes bioactivos como el que se presenta podría ser muy valorado por laboratorios cuya actividad esté relacionada con el análisis de rutina de muestras que contengan este tipo de analitos.

Para centrar la importancia de las metodologías analíticas desarrolladas en este capítulo, a continuación se presentan las características más relevantes y de forma general de los compuestos bioactivos de carácter alimentario. Seguidamente, se describe el bioactivo curcumina ya que es el que aquí se estudia con mayor profundidad desde el punto de vista analítico.

Compuestos con potencial actividad biológica

La calidad de la dieta es un factor que contribuye de forma muy relevante a la salud humana. Esta creencia se ha mantenido desde tiempos inmemoriales en la historia humana. Ya las primeras culturas de la Edad Antigua presagiaban la posible relación entre la salud y los hábitos alimentarios, permaneciendo vigente hasta la actualidad. Este factor, acompañado con la actividad física y la calidad de vida, juega un papel muy importante en la mejora de la salud.¹

En las últimas décadas, numerosos estudios científicos han demostrado cómo la intervención dietética puede influir en la prevención, mitigación o incluso tratamiento de numerosas enfermedades no transmisibles como las cardiovasculares, diabetes, obesidad, osteoporosis, inflamación e incluso en algunos tipos de cáncer.²⁻⁴ De hecho, la evidencia epidemiológica muestra que la prevalencia de este tipo de enfermedades es menor en poblaciones con dietas que implican una mayor ingesta de compuestos bioactivos, la conocida como dieta Mediterránea.⁵ También se ha mostrado especial interés en cómo influye la alimentación en el sistema inmunológico, en el retraso del proceso de envejecimiento y en su contribución a la capacidad intelectual y la productividad física.⁶ Actualmente, la sociedad se encuentra inmersa en una transición desde el punto de vista nutricional.

Se considera componente bioactivo de un alimento, a aquel que aporta un beneficio a la salud más allá de los considerados como nutrición básica. Generalmente, estos componentes están presentes de forma natural en pequeñas cantidades en productos de origen vegetal y en alimentos ricos en lípidos.⁵ Los compuestos bioactivos que incluyen polifenoles, carotenoides, vitaminas, ácidos grasos omega-3, ácidos orgánicos, nucleósidos y nucleótidos y fitoesteroles han recibido gran atención debido su relación de forma positiva con diversas enfermedades crónicas.⁷ No obstante, aunque en menor medida, los efectos adversos tales como toxicidad, mutagenicidad y alergenicidad en un organismo también son una forma de bioactividad. Estos efectos negativos suelen depender de la dosis y la biodisponibilidad de una determinada sustancia.⁵

En la presente Tesis Doctoral se han considerado compuestos bioactivos de carácter alimentario los cuales se caracterizan por sus potenciales efectos saludables. Algunos de los alimentos entre los que se encuentran son el cacao, frutas, suplementos dietéticos y bebidas conocidas, como el té o el vino, los cuales constituyen fuentes importantes de estos compuestos en la dieta humana. Aun así, es necesario tener un control exhaustivo sobre ellos para conocer la calidad de los mismos puesto que su finalidad es la de ser ingeridos.

El creciente interés por la alimentación saludable junto con determinadas condiciones sociales y económicas han producido una serie de transformaciones dentro de la Ciencia de la Nutrición dando lugar a la aparición de nuevos productos y conceptos muy similares entre ellos como alimentos funcionales, alimentos nutraceuticos, complementos alimenticios, enriquecidos, alimentos medicinales y saludables, etc. En especial, se han superpuesto conceptos de los alimentos nutraceuticos y funcionales, ya que las definiciones sobre los mismos aún no estaban bien establecidas.

Según la definición propuesta por el ILSI (International Life Science Institute) los alimentos funcionales son aquellos “que contienen un componente, nutriente o no nutritivo, con efecto selectivo sobre una o más funciones del organismo, con un efecto añadido más allá de su valor nutritivo y cuyos efectos positivos justifican la reivindicación de su carácter funcional o incluso saludable. Cabe destacar que los alimentos funcionales son considerados como alimentos, mostrando sus efectos en cantidades regulares en una dieta normal y consumida como parte de los hábitos alimenticios comunes”.⁸ Como resultado de la definición anterior, se deduce que este alimento proporciona beneficios específicos para la salud más allá de su valor nutricional. Por otro lado, los alimentos nutraceuticos fueron introducidos por Stephen DeFelice, presidente de la Fundación para la Innovación en Medicina, definiéndolos como “alimentos o parte de ellos que brindan beneficios médicos o de salud, incluida la prevención y/o tratamiento de enfermedades. Estos productos pueden abarcar desde nutrientes aislados, suplementos alimenticios, alimentos transgénicos, alimentos funcionales hasta productos herbales y alimentos procesados”.⁹

A pesar de que actualmente no existe una definición clara que diferencie la controversia que hay entre los alimentos funcionales y nutraceuticos, se han recopilado una serie de características clave para aclarar las diferencias que existen entre ellos. Mientras que los alimentos funcionales reducen enfermedades, pero no las mitigan, su aspecto es el de los alimentos convencionales y forman parte de la dieta diaria, los nutraceuticos previenen enfermedades e incluso forman parte de tratamientos terapéuticos, se comercializan en formato de fármaco (cápsulas, comprimidos, polvo, etc) y son consumidos como suplementos dietéticos.¹⁰ Los nutraceuticos y los alimentos funcionales se han vuelto muy populares entre la población debido a la demanda de los consumidores de alimentos saludables que posiblemente podrían reducir algunos riesgos para la salud y mejorar diversas condiciones de salud.¹¹

Lamentablemente, el uso de compuestos orgánicos de naturaleza lipofílica en la industria alimentaria ofrece varias limitaciones, como su solubilidad acuosa, biodisponibilidad o sensibilidad al pH o a otras situaciones de estrés. Así, una gran variedad de moléculas bioactivas lipofílicas como son algunos polifenoles, ácidos grasos, carotenoides, antocianinas, flavonoides, xantofilas, entre otras son poco solubles en agua e incluso pueden sufrir alteraciones cuando se exponen a diferentes medios como es el entrono gástrico, pudiendo llegar incluso a producirse una rápida degradación. Como solución a estos problemas han surgido varios enfoques nanotecnológicos como diferentes sistemas de nanoencapsulación y/o nanodeliberación.¹²

La introducción de la nanotecnología en el campo de los alimentos ha apoyado la evolución de la fabricación de alimentos seguros y de alta calidad con propiedades funcionales, utilizando procesos biológicos eficientes y sostenibles. Los materiales nanométricos tienen numerosas aplicaciones en el sector alimentario, específicamente en la innovación, conservación o protección y envasado, aportando mejoras sensoriales (sabor, color, textura, etc), mayor absorción y suministro específico de nutrientes y compuestos bioactivos, estabilización de ingredientes activos como nutraceuticos en estructuras de alimentos, aumento de la vida útil, la calidad y seguridad, entre muchos otros aspectos.¹³

Así, la nanotecnología aprovecha las nuevas características y funciones que solo se dan a esta escala. Esto se debe a que las nanopartículas tienen una elevada área por unidad de masa, lo que les permite ser biológicamente más activas. Algunas de estas propiedades mejoradas son: disponibilidad, liberación, solubilidad y actividad biológica, ya que logran periodos de residencia más prolongados en el tracto gastrointestinal, logrando así una absorción más eficiente a través de las células.¹⁴ En definitiva, como se muestra en la **Figura III.1**, el efecto de las nuevas formulaciones suele ser el de una mayor absorción del bioactivo y su metabolismo suele ser menor, debido a la estabilidad y protección frente al medio externo que le confiere la encapsulación. Por lo tanto, la excreción será mayor para el bioactivo lipofílico convencional, mientras que las nuevas formulaciones presentan una menor eliminación.

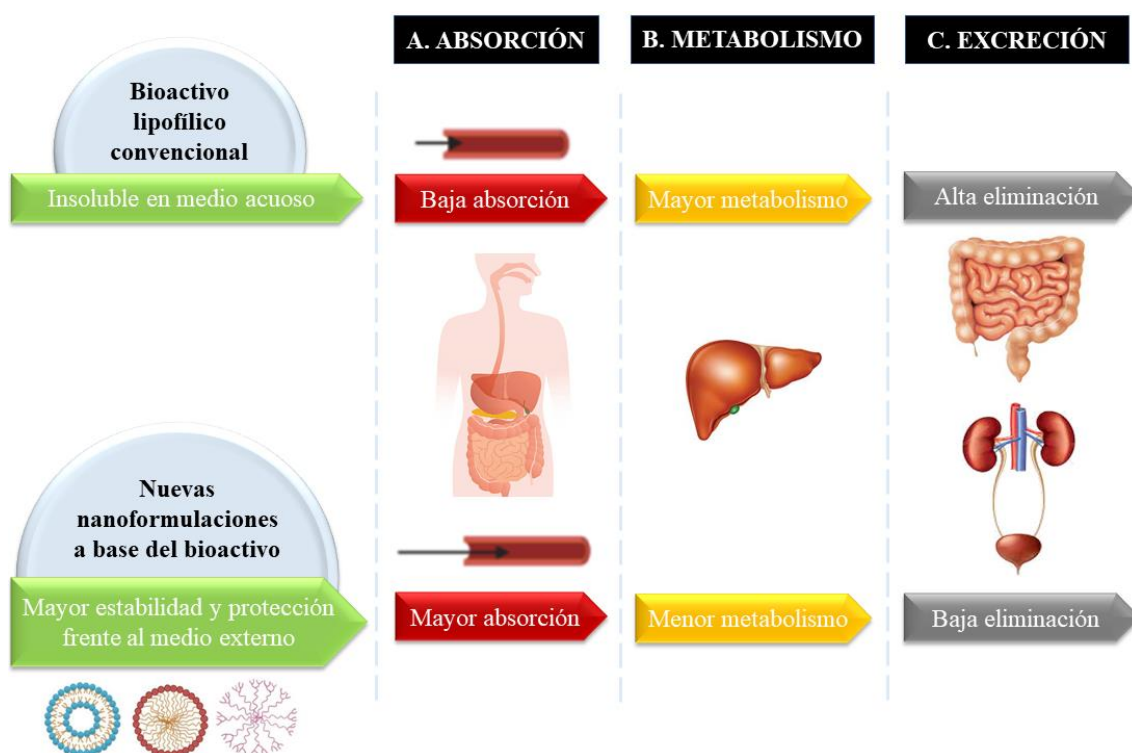


Figura III.1. Efecto en absorción, distribución, metabolismo y excreción de los bioactivos lipofílicos convencionales frente a las nuevas nanoformulaciones a base del bioactivo.

Como consecuencia a todo lo anteriormente mencionado, se han realizado muchos intentos para proporcionar métodos analíticos sensibles y selectivos para la determinación y caracterización de compuestos bioactivos en matrices alimentarias.

Curcumina

La cúrcuma es una planta herbácea que suele ser cultivada en las regiones tropicales y subtropicales, siendo la India el principal productor.¹⁵ El principal ingrediente activo de la cúrcuma (*Curcuma longa*) es la curcumina, aislado por primera vez en 1815, un compuesto polifenólico ampliamente conocido por sus propiedades beneficiosas para la salud humana. La curcumina suele ser utilizada en la cultura oriental como especia, remedio de herbolario y colorante alimentario.¹⁶ Este bioactivo es conocido químicamente como diferuloilmetano, cuyo nombre IUPAC es (1E,6E)-1,7-bis(4-hidroxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona, su fórmula molecular es $C_{21}H_{20}O_6$ y su peso molecular es de $368,4 \text{ g mol}^{-1}$. El extracto de cúrcuma contiene tres curcuminoides principales denominados curcumina, demetoxicurcumina y bisdemetoxicurcumina (**Figura III.2a**), siendo el mayoritario el primero de ellos.¹⁷ Además de los curcuminoides, la cúrcuma está compuesta por carbohidratos, proteínas, minerales, grasas aceites esenciales y trazas de vitaminas.¹⁸

La estructura química de la curcumina está formada por dos anillos aromáticos, los cuales presentan grupos o-metoxifenólicos, unidos simétricamente a través de una cadena carbonada de siete átomos de carbono formada por una β -dicetona- α,β -insaturada (**Figura III.2a**).¹⁵ Dependiendo del medio en el que se encuentre el compuesto polifenólico, debido a que presenta tautomería ceto-enólica, predominará la estructura de un confórmero u otro. En medios alcalinos la forma enol es predominante mientras que en medios ácidos o neutros prevalece la forma ceto (**Figura III.2b**).^{15, 19} Como le ocurre a la mayoría de los compuestos bioactivos de naturaleza lipofílica, la curcumina sufre algunas limitaciones siendo totalmente insoluble en medio acuoso a temperatura ambiente, tanto a pH neutro como ácido. No obstante, su solubilidad se ve ligeramente aumentada a pH básicos, sin embargo, se degrada rápidamente en medios alcalinos o neutros.^{18, 20} La baja solubilidad acuosa repercute directamente en la capacidad para ser adsorbida a través de las barreras fisiológicas lo cual implica una baja biodisponibilidad.¹⁶ Todas estas limitaciones hacen que la curcumina sea una molécula inestable en condiciones fisiológicas.^{16, 21}

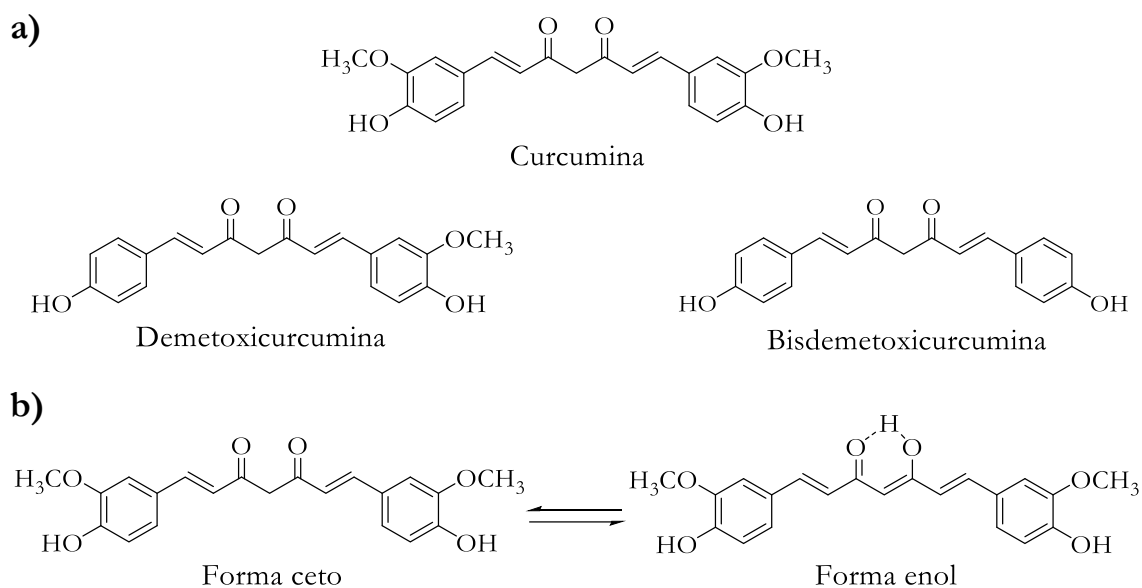


Figura III.2. (a) Estructura química de los curcuminoides y (b) tautomería ceto-enólica de la curcumina.

La curcumina presenta varios centros reactivos en su estructura pudiendo dar lugar a reacciones químicas entre las que se incluyen la donación de átomos de hidrógeno (dando lugar a su oxidación), adición nucleofílica reversible e irreversible (reacción de Michael), degradación, reacciones enzimáticas y la hidrólisis. Estas reacciones químicas explican las propiedades biológicas asociadas a la curcumina.¹⁵

De acuerdo con diferentes organismos internacionales como la EFSA (European Food Safety Authority), la FDA (Food and Drug Administration) y la JECFA (Joint Expert Committee on Food Additives), la curcumina es considerada un compuesto seguro para el consumo humano careciendo de efectos tóxicos severos. Por lo tanto, los efectos terapéuticos que aporta este bioactivo y la seguridad que presenta su ingesta^{22, 23} inducen al estudio y desarrollo de nuevas estrategias que logren mejorar la biodisponibilidad, permeabilidad y degradación por exposición al medio externo. Actualmente, estos problemas se han intentado resolver haciendo uso de la nanotecnología mediante el desarrollo de nanomateriales orgánicos nanoestructurados (OMNs).¹⁰ El desarrollo de nanoformulaciones de curcumina basadas en liposomas, micelas, lípidos sólidos, ciclodextrinas y nanogel, entre otras, tiene como objetivo mejorar parámetros farmacocinéticos importantes, como la solubilidad, biodisponibilidad y estabilidad.

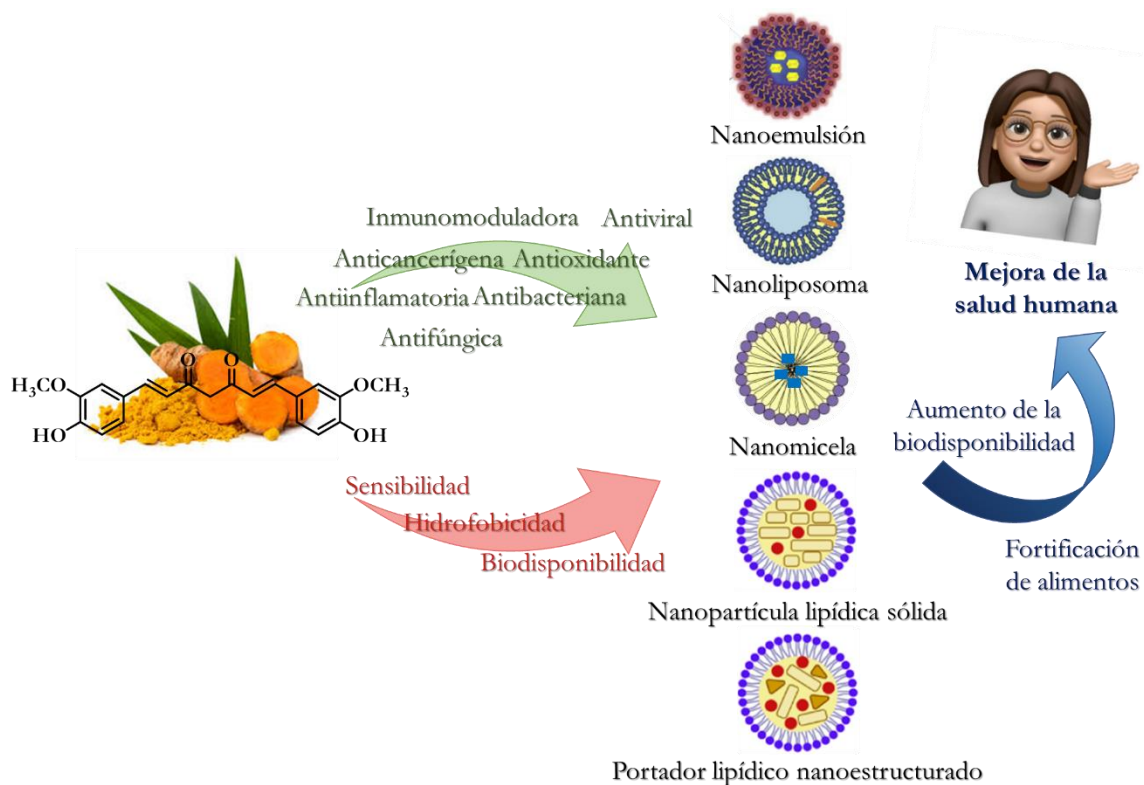


Figura III.3. Nanoportadores basados en lípidos para la encapsulación y posterior liberación de curcumina como bioactivo.

Sin embargo, la mayor biodisponibilidad de bioactivos en las nanoformulaciones genera serias preocupaciones sobre su toxicidad debido a sus tamaños reducidos, gran capacidad reactiva y fácil difusión a través de las barreras biológicas de las células que podrían conducir a su acumulación en ciertos órganos. Actualmente, existen pocos estudios para verificar si el uso de las OMNs puede presentar algún peligro para la salud humana, por lo que es necesario controlar su presencia en las diferentes matrices en las que se encuentren, empezando por las alimentarias.¹³

Seguidamente, se presentan las metodologías desarrolladas que componen este capítulo de la Memoria.

Referencias

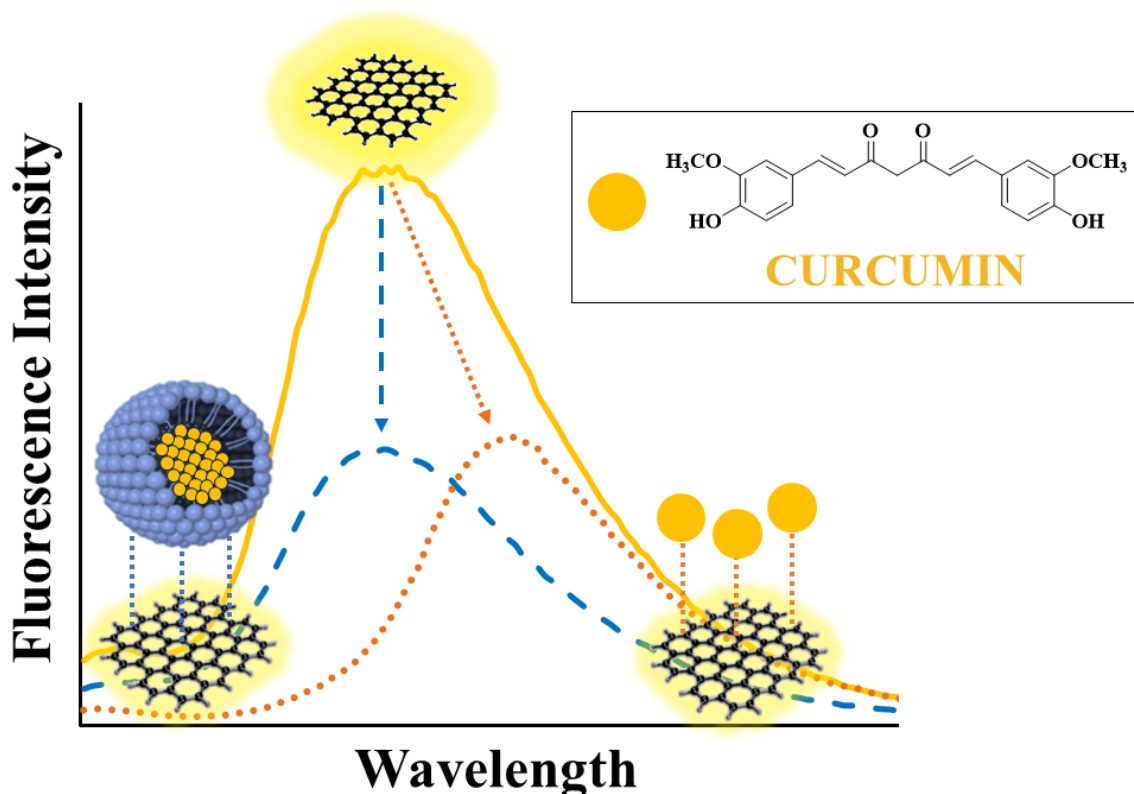
1. Xu, F.; Cohen, S. A.; Lofgren, I. E.; Greene, G. W.; Delmonico, M. J.; Greaney, M. L. Relationship between diet quality, physical activity and health-related quality of life in older adults: Findings from 2007–2014 national health and nutrition examination survey. *The Journal of Nutrition, Health and Aging* **2018**, *22*(9), 1072-1079.
2. Martínez-González, M. A.; Gea, A.; Ruiz-Canela, M. The Mediterranean diet and cardiovascular health: A critical review. *Circulation Research* **2019**, *124*(5), 779-798.
3. Milte, C. M.; Thorpe, M. G.; Crawford, D.; Ball, K.; McNaughton, S. A. Associations of diet quality with health-related quality of life in older Australian men and women. *Experimental Gerontology* **2015**, *64*, 8-16.
4. Reitz, L. K.; Baptista, S. d. L.; Santos, E. S.; Hinnig, P. F.; Rockenbach, G.; Vieira, F. G.; de Assis, M. A.; da Silva, E. L.; Boaventura, B. C.; Pietro, P. F. D. Diet Quality Is Associated with Serum Antioxidant Capacity in Women with Breast Cancer: A Cross Sectional Study. *Nutrients* **2021**, *13*(1), 115-128.
5. Câmara, J. S.; Albuquerque, B. R.; Aguiar, J.; Corrêa, R. C.; Gonçalves, J. L.; Granato, D.; Pereira, J. A.; Barros, L.; Ferreira, I. C. Food bioactive compounds and emerging techniques for their extraction: Polyphenols as a case study. *Foods* **2021**, *10*(1), 37-70.
6. Arvanitoyannis, I. S.; Van Houwelingen-Koukaliaroglou, M. Functional foods: a survey of health claims, pros and cons, and current legislation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **2005**, *45*(5), 385-404.
7. Kamiloglu, S.; Tomas, M.; Ozdal, T.; Yolci-Omeroglu, P.; Capanoglu, E. Bioactive component analysis. In *Innovative Food Analysis*, Elsevier **2021**, pp 41-65.
8. Diplock, A. T.; Aggett, P. J.; Ashwell, M.; Borner, F.; Fern, E. B.; Roberfroid, M. B. Scientific concepts of functional foods in Europe: consensus document. *British Journal of Nutrition* **1999**, *81*(1), 1-27.
9. DeFelice, S. L. The nutraceutical revolution: its impact on food industry R&D. *Trends in Food Science and Technology* **1995**, *6*(2), 59-61.

10. Montes, C.; Villaseñor, M. J.; Ríos, Á. Analytical control of nanodelivery lipid-based systems for encapsulation of nutraceuticals: Achievements and challenges. *Trends in Food Science and Technology* **2019**, *90*, 47-62.
11. Skrovankova, S.; Sumczynski, D.; Mlcek, J.; Jurikova, T.; Sochor, J. Bioactive compounds and antioxidant activity in different types of berries. *International Journal of Molecular Sciences* **2015**, *16*(10), 24673-24706.
12. Huang, Q.; Yu, H.; Ru, Q. Bioavailability and delivery of nutraceuticals using nanotechnology. *Journal of Food Science* **2010**, *75*(1), 50-57.
13. Ranjan, S.; Dasgupta, N.; Chakraborty, A. R.; Melvin Samuel, S.; Ramalingam, C.; Shanker, R.; Kumar, A. Nanoscience and nanotechnologies in food industries: opportunities and research trends. *Journal of Nanoparticle Research* **2014**, *16*(6), 1-23.
14. Chen, L.; Remondetto, G. E.; Subirade, M. Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems. *Trends in Food Science and Technology* **2006**, *17*(5), 272-283.
15. Priyadarsini, K. I. The chemistry of curcumin: from extraction to therapeutic agent. *Molecules* **2014**, *19*(12), 20091-20112.
16. Tsuda, T. Curcumin as a functional food-derived factor: degradation products, metabolites, bioactivity, and future perspectives. *Food and Function* **2018**, *9*(2), 705-714.
17. Patil, B. S.; Jayaprakasha, G. K.; Chidambara Murthy, K.; Vikram, A. Bioactive compounds: historical perspectives, opportunities, and challenges. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2009**, *57*(18), 8142-8160.
18. Kotha, R. R.; Luthria, D. L. Curcumin: Biological, pharmaceutical, nutraceutical, and analytical aspects. *Molecules* **2019**, *24*(16), 2930-2956.
19. Lestari, M. L.; Indrayanto, G. Curcumin. *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology* **2014**, *39*, 113-204.
20. Priyadarsini, K. I. Photophysics, photochemistry and photobiology of curcumin: Studies from organic solutions, bio-mimetics and living cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* **2009**, *10*(2), 81-95.

21. Pulido-Moran, M.; Moreno-Fernandez, J.; Ramirez-Tortosa, C.; Ramirez-Tortosa, M. Curcumin and health. *Molecules* **2016**, *21*(3), 264-285.
22. Kocaadam, B.; Şanlıer, N. Curcumin, an active component of turmeric (*Curcuma longa*), and its effects on health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **2017**, *57*(13), 2889-2895.
23. Kunnumakkara, A. B.; Bordoloi, D.; Padmavathi, G.; Monisha, J.; Roy, N. K.; Prasad, S.; Aggarwal, B. B. Curcumin, the golden nutraceutical: multitargeting for multiple chronic diseases. *British Journal of Pharmacology* **2017**, *174*(11), 1325-1348.

III.1. Discrimination between nanocurcumin and free curcumin using graphene quantum dots as a selective fluorescence probe


Microchimica Acta 2020, 187, 446-457



*Pictorial representation of the photoluminescent behavior of graphene quantum dots (GQDs) in presence of free or encapsulated curcumin into micelles. **Yellow**: tunable visible emission response from surface-delocalized electronic states of GQDs. **Orange**: fluorescence emission of GQDs while interacting with free curcumin in solution. **Blue**: GQD emission in presence of nanosized-micelles containing curcumin.*



Discrimination between nanocurcumin and free curcumin using graphene quantum dots as a selective fluorescence probe

Esther Pinilla-Peñalver^{1,2} · M. Laura Soriano¹ · Gema M. Durán^{1,2} · Eulogio J. Llorent-Martínez³ · Ana M. Contento² · Ángel Ríos^{1,2} 

Highlights

- Eco-friendly synthesis of GQDs and characterization.
- Preparation of nano-sized micelles of curcumin (referred as nanocurcumin).
- Quenching of GQD emission when interacting with nanocurcumin.
- Quenching and red-shifting of GQD emission in presence of free curcumin.
- Discrimination of curcumin in diverse environments using GQDs as fluorescent sensor.
- Application of a fluorometric method for determining and discriminating curcumin and nanocurcumin.

Abstract

Accurate-controlled sized graphene quantum dots (GQDs) have been used as an analytical nanoprobe for detecting curcumin as function of the photoluminescent quenching upon increasing concentrations of the analyte. Regarding the importance of curcumin nanoparticles in nutraceutical food, the analytical method described herein was also proven for the discrimination of curcumin remaining in free solution from that encapsulated into water-soluble nanomicelles of ca. 11 nm. This recognition is based on the displacement of GQD emission when interacting with both curcumin species. Maximum emission wavelength of GQDs suffers a gradual quenching as well as a red shifting upon increasing concentrations of free curcumin (from 458 to 490 nm, exciting at 356 nm). On the other hand, in presence of nanocurcumin, the GQD photoluminescent response only displays a quenching effect (356/458 nm). The sensitivity of the described method in terms of detection limits were of 0.3 and 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for curcumin and nanocurcumin, respectively. The applicability of the

photoluminescent probe for the quantification and discrimination between both curcumin environments was demonstrated in nutraceutical formulations and fortified beverages such as ginger tea.

Keywords

Sensing method; Recognition; Red shift; Bioactive encapsulation; Curcuma; Nutraceuticals; Nanomaterials.

III.1.1. Introduction

Curcumin is a lipophilic compound with substantial health benefits wielding their pharmacological actions¹ and chemoprotective properties for improving treatments of several diseases.²⁻⁴ It is characterized by poor aqueous solubility and, thus, low bioavailability,⁵ high instability or degradation at basic aqueous medium⁶ and under light radiation, limiting their distinctive benefits. Food technology has achieved solutions to such inconveniences by encapsulating curcumin into macromolecules and nanostructures (using cyclodextrin cavities and lipid nanostructures, namely micelles, nanogels or phospholipid complexes as new carrier systems) to improve thus their permeation and penetration into the body.^{7, 8} Once curcumin is encapsulated, nanocarrier systems transport the active substance through the gastrointestinal tract into the bloodstream, achieving greater bioavailability. Encapsulated curcumin is now found in many foodstuffs and dietary supplements. However, some of these nanoformulations suffered major food-safety considerations⁹ due to surfactants and other stabilizing additives added for preventing agglomeration and speeding the unwrapping of the active ingredients. Furthermore, these nanotechnological approaches as outstanding solutions may also have a negative connotation as occurred with engineered nanoparticles. Unfortunately, few toxicological information about these nanosized formulations of curcumin has been evaluated. Many of these nanosized particles are likely to display adverse effects owing to their small size and fast diffusion through the whole body, specifically above certain dosage, being of great concern the need of future stability studies in food samples and the related nanotoxicological studies.¹⁰ Thus, monitoring and quantifying the fabrication and stabilization of such nanosized curcumin in food and supplementary

matrices is crucial to ensuring the consumer safety. Most of reports focused on the determination of free curcumin (referred as Cur) in several types of samples by analytical techniques including voltammetry,¹¹ spectrometry,¹² colorimetry,¹³ spectrofluorimetric^{14, 15} and chromatography with ultraviolet detection.^{16, 17} Only a few works reported the detection of diverse curcumin nanoformulations by fluorometric¹⁸ or HPLC methods,^{19, 20} although their detection/quantification always involved the breakup of curcumin-containing nanosystems. However, it is of great importance the quantification of curcumin in diverse nanoformulations preserving their nature and environment.

In this regard, our attention is focused on detecting a specific food-nanocarrier system, particularly curcumin-loaded nanomicelles (referred as nanocurcumin, NCur) as one of the most common nanosized formulations in nutraceuticals. To achieve this challenge, alternative ways to the classical analytical methodologies are required, as for instance the use of fluorescent carbonaceous nanomaterials as analytical tools offers prominent opportunities in a variety of research fields.^{21, 22}

Foremost among this family, non-toxic GQDs which are characterized by their high surface area, low-toxicity, high water solubility, tuneable surface functionalities, and exceptional optical and electrical properties can be exploited in the development of interesting applications.^{23, 24} This graphitic structure that contains multiple functionalities at the edges seems to be a good candidate as fluorescent probe for developing real-world analytical tools. This affords their use to distinguish between diverse food formulations, which it seems to be lacking in literature.

This paper points out for the first time a simple approach based on the use of GQDs as a fluorescence detection strategy, to discriminate between NCur and Cur. Its applicability as a sensing probe for the recognition of both curcumin environments in food (tea beverage and nutraceuticals) was also investigated with reliable results. In particular, this work proposes the first analytical methodology for the quantification of a type of nanostructured curcumin in food samples, thus contributing to the third way of Analytical Nanoscience and Nanotechnology²⁵ by incorporating nanomaterials as tool and analyte, both in the same analytical process.

III.1.2. Experimental section

III.1.2.1. Reagents and materials

All chemical reagents were obtained from commercial sources of analytical grade and were used as received without further purification. Uric acid (UA, $\geq 99.0\%$) was purchased from Alfa Aesar (Kandel, Germany) and sulfuric acid (98%) was acquired from Labkem (Barcelona, Spain). Curcumin mixture ($\geq 64.0\%$), analytical standards of curcumin ($\geq 98.0\%$), desmethoxycurcumin ($\geq 95.0\%$) and bisdemethoxycurcumin ($\geq 95.0\%$), sodium hydroxide (98.0%), polyethylene glycol sorbitant mono-oleate (tween 80, with $\geq 58.0\%$ oleic acid), 4-morpholineethanesulfonic acid hydrate (MES, $\geq 99.5\%$) and Kaiser test kit were obtained from Sigma Aldrich (Madrid, Spain). Quinine sulfate dihydrate ($\geq 99.0\%$) was acquired from Acros Organics (New Jersey, USA). Other interference species such as omega-3, glucose, sucrose, lactose, ergocalciferol (vitamin D₂), cholecalciferol (vitamin D₃), sodium dodecyl sulfate (SDS) and potassium, calcium and sodium chloride were acquired from Sigma Aldrich (Madrid, Spain). All aqueous solutions were prepared using 18.2 M Ω cm water, purified with a Milli-Q water system (Millipore, Molshem, France). Solvents as acetone ($\geq 99.9\%$), methanol ($\geq 99.9\%$), hydrochloric acid (37%) and absolute ethanol (99.8%) were obtained from PanReac (Barcelona, Spain).

Stock standard solution of curcumin was prepared in ethanol at pH 6 fixed with MES hydrate buffer. All solutions were kept at room temperature in absence of light. Regarding the samples, curcumin encapsulated into nanomicelles in the format of capsules were purchased from NovaSOL company (www.cellinnov.com) while ginger tea was acquired from a local supermarket.

GQDs and nanocurcumin were filtrate in nylon membranes for 0.45 μm pore size previously to perform all the measurements.

III.1.2.2. Instrumentation

Absorption spectra of GQDs and the curcuminoids were obtained using a SECOMAN UVI Light XS 2 spectrophotometer equipped with a LabPower V3-50

using 10 mm quartz cuvettes. Fluorescence spectra were recorded on a QuantaMaster40 spectrofluorometer from Photon Technology International equipped with a 75 W continuous xenon short arc lamp using a detector voltage of 981 V. SOC-10 USB interface FelixGX software was used to collect and process fluorescence data. Emission and excitation slit widths were both 2 nm unless otherwise specified. All optical experiments were performed at room temperature.

Infrared spectrum of the solid powder of GQDs was recorded with a crystal ATR of ZnSe Shimadzu, IRAffinity-1S model and DTGS Standard detector. Raman measurements of GQDs were performed by a portable Raman spectrometer model B&W TEK (i-RAMAN BWS415) using a 785 nm wavelength laser operating at a maximum output power of 300 mW. The solid sample was deposited on a silica (SiO₂/Si) plate. Exposure time was set at 10,000 ms per scan and GQD Raman curve was the average of 3 scans for a total integration time of 30 s. Acquisition data was obtained with a BWSpec4™ software.

Particle size distribution, polydispersity index and zeta potential of the nanostructures were determined by dynamic light scattering (DLS) and electrophoretic light scattering (ELS) measurements using a Zetasizer Nano system at 25 °C using ultrapure water as the dispersing medium.

The surface morphology was studied by atomic force microscope (AFM) using a NT-MDT Solver model. The dispersion of GQDs was diluted (1:5) using ultrapure water and deposited into a thin mica plate.

Cryogenic scanning electron microscopy (cryo-SEM), which combines the high-resolution scanning electron microscopy (HR-SEM) with cryogenic sample preparation techniques, enables to investigate structures and materials in their native hydrated state. Cryo-SEM analyses were carried out using a ZEISS GeminiSEM 500 equipment to evaluate the size and shape of curcumin-loaded nanomicelles.

The pH of all aqueous solutions used were measured using a Crison Basic 20 pH-meter with a combined glass electrode (Crison Instruments S. A, Barcelona, Spain). An ultrasonic cleaning bath Ultrasounds (Selecta, Barcelona, Spain), a microcentrifuge BioSan Microspin 12 (LabNet Biotecnica S. L., Madrid, Spain), a

vortex stirrer V05 series (LBX Instruments, Barcelona, Spain) with speed control and a 254/365 nm UV lamp 230 V, E2107 model (Consort BVBA, Turnhout, Belgium) were also used.

III.1.2.3. Synthesis of graphene quantum dots

The synthesis of two types of GQDs were prepared using UA as carbon precursor following an acidic treatment previously reported by our group²⁶ with slight modifications. In two two-neck flasks, 0.5 g of UA were mixed with 1 mL of concentrated sulfuric acid for 1 h under continuous stirring at 180 and 200 °C in an oil bath. The resulting brownish products were let to cool down to room temperature and diluted until 150 mL with deionized water and then neutralized with NaOH. Both suspensions were then treated with a mixture of methanol and acetone (1:4, v/v) under vigorous stirring and subsequently filtered through a 0.45- μ m nylon membrane in a Millipore system to separate the precipitated large particles. Finally, the organic solvent from the solutions was removed by evaporation under reduced pressure. The resulting concentration for both GQD types were ca. 11 mg mL⁻¹.

III.1.2.4. Quantum yield measurement of graphene quantum dots

The relative quantum yield (QY) was calculated by measuring the absorbance and fluorescence of GQDs prepared at 200 °C at different concentrations.²⁶ It was used quinine sulfate as the reference fluorophore of known QY²⁷ under the same experimental conditions since it is comparable to the ensuing GQDs. All measurements were carried out in 1 cm quartz cuvettes at room temperature. Absorbance was measured below 0.1 at excitation wavelength of 356 nm in order to reduce reabsorption effects.

III.1.2.5. Preparation of encapsulated curcumin

A curcumin solution (4 mM) in ethanol was added dropwise under vigorous stirring into 5 mL of aqueous solution of tween 80 to achieve a final concentration of 1 mM (> 0.012 mM corresponding to its critical micellar concentration, CMC) with 6% of pure curcumin. The volume of the ethanolic solution of curcumin to add will

depend on the purity of the bioactive. Nanocurcumin was formed after stirring and sonicating the mixture during 10 and 5 min, respectively (**Figure III.1.1**).

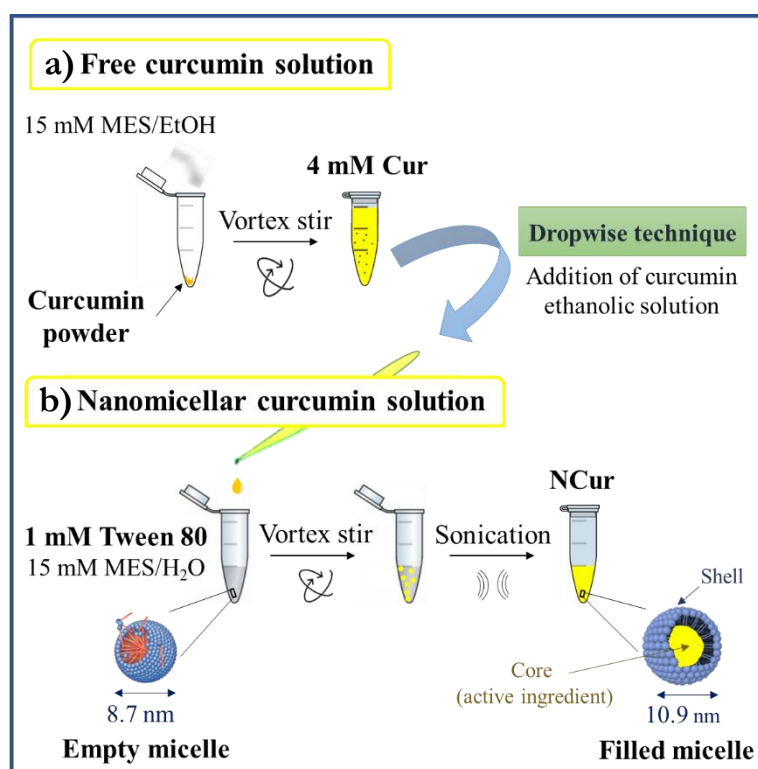


Figure III.1.1. Illustration of the preparation process of (b) curcumin micellar formulation (NCur) from (a) free curcumin solution (Cur).

The incorporation of the active ingredient into the micellar component was carried out at room temperature. All solutions were kept protected from light. In order to remove the unloaded curcumin into the nanomicelles, curcumin-loaded micelles were filtered through a 0.45 μm pore-size nylon membrane, assuming the retained curcumin being outside the micelle (non-encapsulate). The concentration of nanocurcumin in each filtered solution was then recalculated taking into consideration the quantification of non-encapsulated curcumin (free curcumin) after being eluted from the filter with methanol and measuring the subsequent concentration spectrophotometrically at 425 nm.

The encapsulation efficiency (%EE) of curcumin into tween 80 nanomicelles was determined after the separation of curcumin-loaded nanoparticles, NCur, from non-entrapped curcumin, Cur, using a nylon filter membrane. The entrapment efficiency was calculated as indicated in equation 1:

$$\%EE = \frac{[\text{Curcumin}]_{total} - [\text{Curcumin}]_{free}}{[\text{Curcumin}]_{total}} \cdot 100 \quad \text{Eq (1)}$$

III.1.2.6. Samples preparation and analytical procedure

Tea samples were prepared as usual; briefly, a tea bag of ginger was immersed into 30 mL of deionized water (adjusted to pH 6 with 15 mM MES buffer) for 5 min at room temperature. The brownish tea solution was filtered to remove any suspended tea particle and the filtrate was used to prepare the working solution for the analysis. The samples were enriched at four concentration levels from 5.0 to 40.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of Cur or between 1.5 and 4.6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of NCur.

For preparation of a commercial nutraceutical food sample namely NovaSOL curcumin, the viscous oil content of a capsule of this product was dissolved and stabilized in a mixture of 1 mM of tween and 15 mM MES buffer at pH 6. The resulting solution was filtered in a 0.45 μm nylon membrane for the estimation of the concentration of NCur in the sample.

In the interaction studies, GQD aqueous solutions (200 μL , 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$) were mixed with curcumin solutions (200 μL of free or nanoencapsulated one) at pH 6 at room temperature for 5 min under stirring to ensure complete interaction. After that, these mixtures were transferred into a 10 mm quartz cuvette to perform the optical measurements avoiding the incidence of light.

Fluorescence measurements were carried out recording the emission spectra of GQDs between 376 and 600 nm using an excitation wavelength of 356 nm. Both excitation and emission slit widths were set at 0.5, while the step size and integration time were of 2 nm and 0.3 seconds, respectively. The I_0/I ratio was used as analytical signal, where I_0 and I were the maximum fluorescence emission intensity of GQDs in the absence and presence of curcumin species, respectively. When samples were analyzed, Cur or NCur standard solutions were replaced by the nutraceutical food or tea samples prepared as described at the beginning of this section.

Discrimination between free curcumin and nanocurcumin was performed by monitoring the red shifting in the emission wavelength of GQDs.

III.1.3. Results and discussion

III.1.3.1. Characterization of GQDs

Fluorescent graphitic structures have been synthesized following the bottom-up approach previously described by our group.²⁶ Carbonization of uric acid at diverse temperatures were studied. In the synthetic conditions, the heating process was crucial to achieve GQDs of high quality. At temperatures of 180 °C, the resulting solution displayed a high photoluminescent properties although the emission was excitation dependence as a result of the presence of multiple emitters, as occur in other carbon nanodots.²⁸ However, at 200 °C a more controlled process for the bottom-up fabrication of pure graphene nanolayers were obtained since the emission was not tunable with the excitation wavelength. Thus, we focused on the second synthesized material for their higher uniformity and homogeneity of the in terms of size and surface defects.

The GQDs average hydrodynamic size found by DLS ($n = 3$) under the appropriate conditions (6.4 ± 1.4 nm, see **Figure III.1.2a**) is consistent to the 6.0 ± 0.8 nm circular flat sheets that were observed by AFM measurements ($n = 3$) (**Figure III.1.2b**).

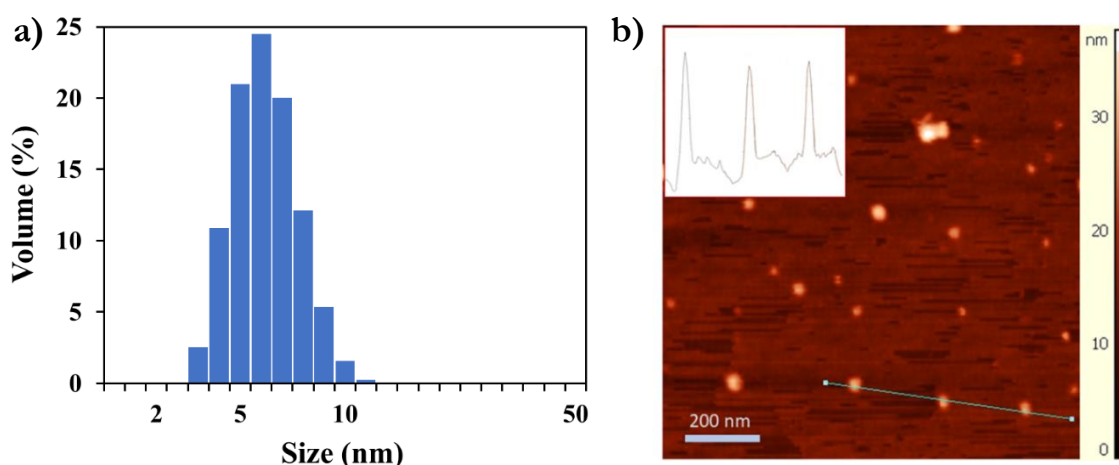


Figure III.1.2. (a) Size distribution of ensuing GQD aqueous solution at neutral pH, calculated from the volume weighted distribution (98%) and (b) its AFM topography. Inset: high profile of the selected nanodots.

Optical properties of GQDs are of great importance. **Figures III.1.3a** and **III.1.3b** show the yellow aqueous solutions of the nanodots at diverse pH values under sunlight and displaying different blue fluorescence intensities under the UV-light irradiating at 365 nm. **Figure III.1.3c** illustrates differences in the GQD fluorescence according to the pH value, showing the maximum fluorescence at pH 7.5.

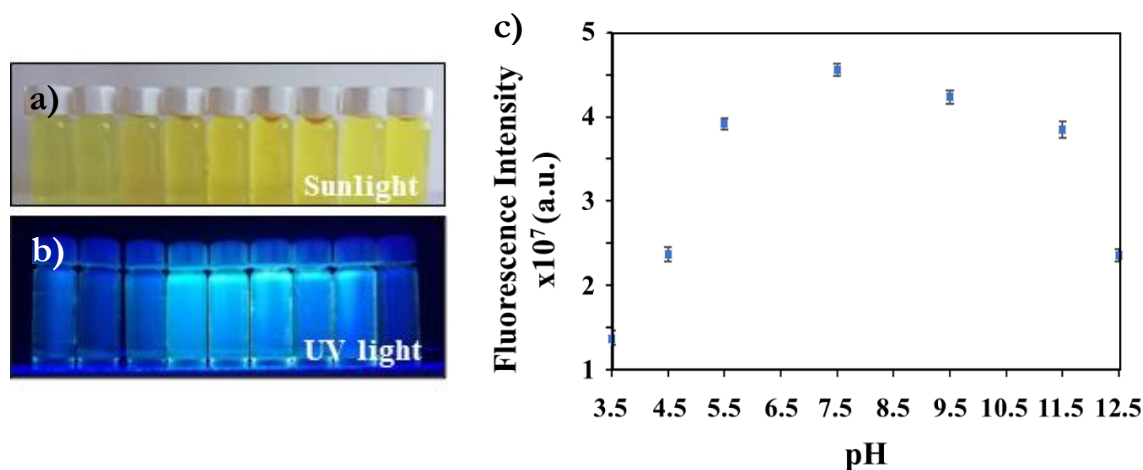


Figure III.1.3. Illustration of the GQD aqueous solutions at different pH values (a) under sunlight and (b) UV light. From left to right the range of pH is from 3.5 to 12.5. (c) Influence of pH in the emission intensity of GQDs exciting at 356 nm. Error bars are given in black.

GQD absorption (blue line), excitation (green line) and emission (orange line) spectra show characteristic profiles consistent to previous studies,²⁶ as can be observed in **Figure III.1.4**. Thus, GQDs exhibit sharp absorption peaks at 222 and 262 nm characteristic to the π - π^* transitions of sp^2 carbon hybridization and a broader absorption band at 375 nm, attributed to the n - π^* transitions by the presence of C=O as surface defects in the graphene layer.

Besides, the fluorescence emission intensity differs depending on pH, suggesting the presence of ionisable groups at the graphitic edges. GQD emission band at 458 nm when exciting at the maximum absorbance wavelength (λ_{exc} 356 nm) displays a full width at half maximum of 81 nm, indicating a narrow size distribution of the nanolayers. On the contrary of their analogues carbon quantum dots and carbon nanodots,²¹ the GQD emission found is not tunable as a result of the maximum emission wavelength being independent on the excitation, implying uniformity in both size and surface states of the ensuing graphitic layers. That fact

suggests that the individual emitters within the nanolayer lack of a collective effect from diverse compositions of particle surfaces-cores. Regarding the probability of the excited state being deactivated by fluorescence, QY of GQD aqueous solution resulted to be 0.41 using quinine sulfate (dissolved in 1N H₂SO₄, QY 0.54) as reference,²⁷ being this value similar to that obtained in previous publications.²⁶

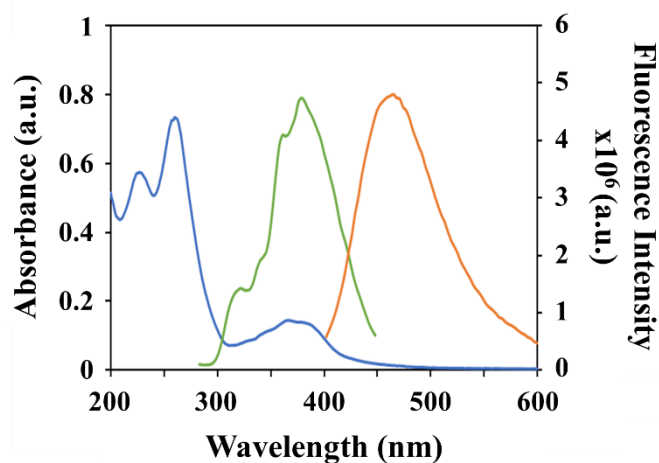


Figure III.1.4. UV-Vis absorption spectrum (blue line), excitation (green line) and fluorescence emission (orange line) spectra of GQDs prepared at 200 °C.

Interestingly, it was found that the emission intensity of the nanodots remain unchanged in presence of ethanol, while the signal stability fluctuates in presence of different proportions of methanol.

Raman profile of GQDs (**Figure III.1.5a**) shows the characteristic bands of graphitic structures at 1309 (D band) and 1593 cm⁻¹ (G band). At around 2615 cm⁻¹ the 2D band is also observed. I_D/I_G ratio for the ensuing GQDs resulted to be of 1.18, indicating the presence of abundant defects in the structure. In solid state, IR characteristic peaks of GQDs (**Figure III.1.5b**) at 3150 and 3062 cm⁻¹ suggests the presence of N-H stretching vibrational modes of amine functionalities possibly forming hydrogen bonding.²⁹ Bands at 2830 and 612 cm⁻¹ are related to aliphatic CH stretching and deformation vibrations attributed to the aromatic framework containing any alkane fragments, respectively. Other peaks at 1688, 1580, 1408 cm⁻¹ may be associated to C=O, C=C, C-O-H stretching vibrational modes of the aromatic framework. Interestingly, Kaiser test results corroborated the presence of free amine

groups; the average content, measured in quintuplicate, resulted to be in $13.8 \pm 1.5 \mu\text{mol g}^{-1}$ at the graphitic nanolayers.

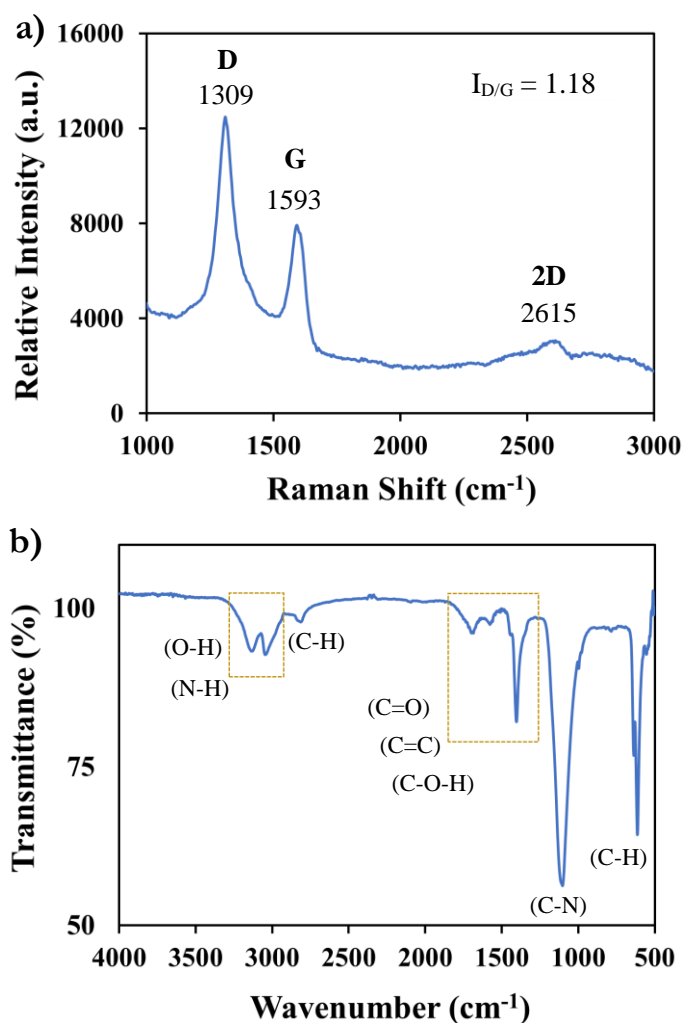


Figure III.1.5. (a) Raman and (b) infrared spectra of the ensuing GQDs.

III.1.3.2. Preparation and characterization of free and encapsulated curcumin

Nanoparticle-based delivery systems are widely used to design nutraceuticals of several active ingredients.³⁰ In this work, non-ionic surfactant tween 80, which is safely used in food, was selected giving rise to clear solutions of micelles of small size, acceptable polydispersity, excellent thermodynamically stability and high encapsulation features. Due to the low water solubility of curcumin, it is convenient the use of a small percentage of organic solvent (co-solvent), being ethanol chosen for producing less toxic and more stable solutions. In addition, to avoid curcumin degradation into vanillin, *p*-hydroxybenzaldehyde, ferulic aldehyde, *p*-hydroxybenzoic

acid, vanillin acid and ferulic acid, standard curcumin solutions were prepared fresh daily and protected from light.

To obtain curcumin-loaded nanoparticles with satisfying properties, several processing parameters were investigated including type of solvent, pH of the medium, type and concentration of the buffer, surfactant and curcumin concentrations, stirring and sonication time. The best conditions to obtain NCur were using an ethanolic stock Cur solution of 4 mM. Such Cur solution was added dropwise to an aqueous phase containing 1.15 mM of empty nanomicelles from tween 80, formed by exceeding its CMC. Considering the pH range to avoid the micelle breakage, the selected pH of the micellar solution was fixed at 6 with MES hydrate buffer. Nanomicellar curcumin was prepared employing 90.7% of tween 80 with a final concentration of 1 mM and 9.3% of curcumin powder (6% pure curcumin). These proportions vary according on the purity of the bioactive. Both phases are homogenized with high stirring in vortex for 10 min while the dropwise addition and then another 5 min of sonication to facilitate the penetration of the active ingredient into the micelles. After that, filtration took place in a 0.45 μm nylon filter to separate the NCur formed from the remaining non-encapsulated curcumin, Cur, which was retained in the filter membrane. Previously, it was verified that Cur contained in ethanolic solution was completely retained in a nylon filter membrane whilst NCur passed through it. The hydrophobic force of Cur driven aggregation enabling its retention in the filter. The separation of Cur from NCur was corroborated using spectrophotometry and DLS techniques.

The optical and microscopic characterization of synthesized NCur was carried out. **Figure III.1.6a** shows the absorption spectra of NCur and ethanolic solution of Cur. As can be seen, absorption of Cur resulted in a small band at 265 nm and a main band centered at 425 nm, attributed to $n-\pi^*$ and $\pi-\pi^*$ transitions, respectively.³¹ However, NCur displays the characteristic band of the tween and a narrower band slightly shifted to 420 nm with a shoulder at 445 nm.³² By examining the fluorescence properties of both species (**Figure III.1.6b**), it is evidenced the encapsulation process, since a blue shift in the emission of NCur with respect to Cur was found. Thus, the blue shifts in the absorbance and fluorescence spectra of NCur are likely

due to intermolecular interactions between the bioactive and hydrophobic inner shell of tween 80.

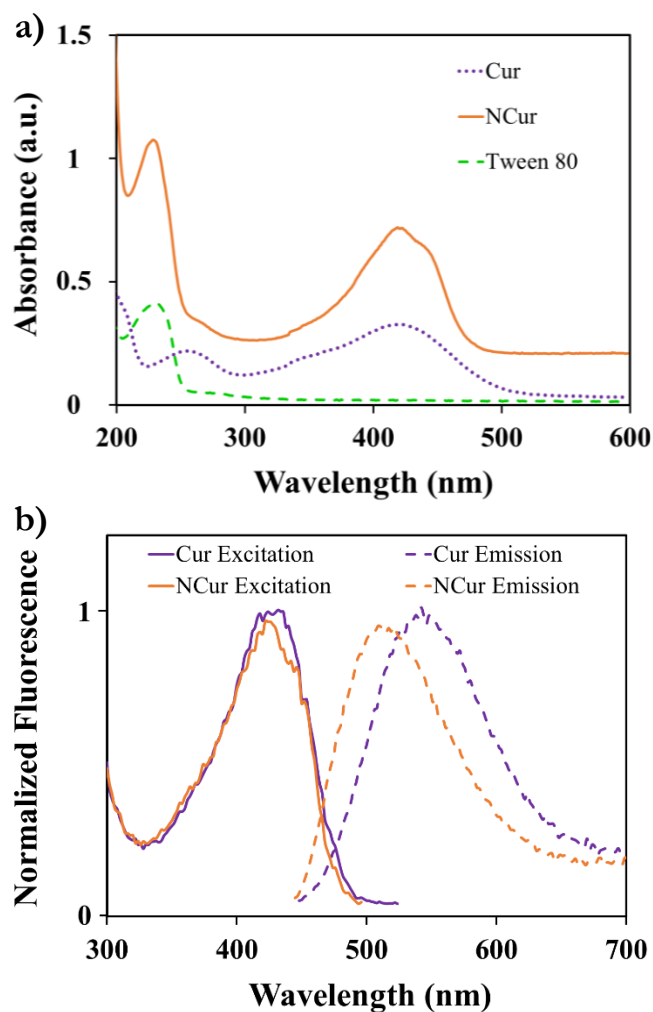


Figure III.1.6. (a) Absorbance spectra of Cur, NCur and Tween 80 solutions and (b) the corresponding excitation and emission profiles of Cur and NCur species. Excitations/emissions at 430/541 nm and 426/517 nm for Cur and NCur, respectively.

The surface charge and the hydrodynamic size distribution of the ensuing nanomicelles were measured by DLS technique. The zeta potential value of NCur resulted to be -15.1 ± 3.4 mV, indicating that these nanoparticles are relative stable in solution. **Figure III.1.7a** shows narrow size distributions with averages of 8.7 ± 1.3 nm and 10.9 ± 1.9 nm for empty and filled micelles, respectively. As expected, the size of the empty nanomicelles was slightly smaller than those loaded with curcumin. Cryo-SEM analyzes (**Figure III.1.7b**) provided the spherical

morphology of the micelles corroborating the average size of NCur previously obtained by DLS.

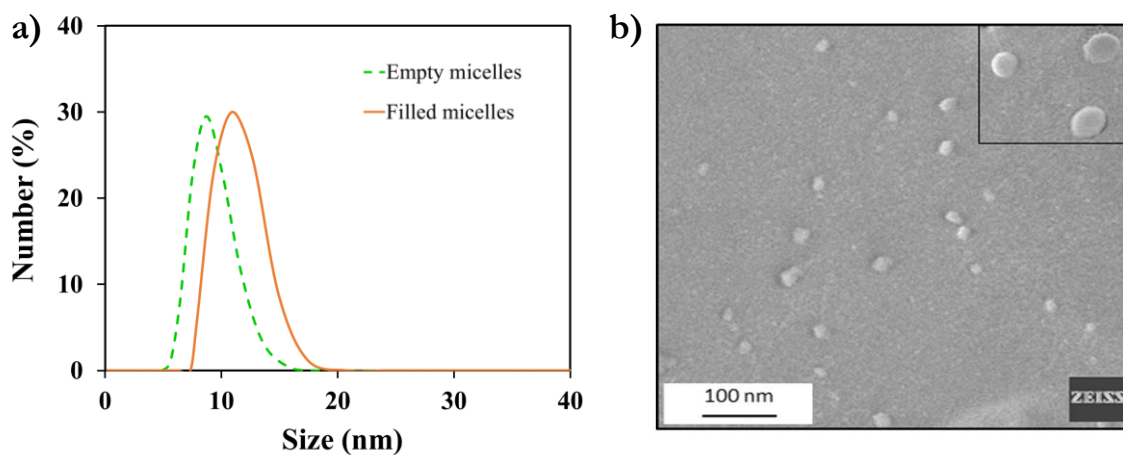


Figure III.1.7. (a) Average hydrodynamic size ($n = 5$) of empty and filled nanomicelles measured by DLS technique and (b) morphology of freeze-dried curcumin-loaded micelles from SEM micrograph.

To characterize the entrapment efficiency, the amount of curcumin loaded into the tween micelles was established as the difference between the total concentration used to prepare the micellar solution and the curcumin concentration recovered from the filter membrane, free curcumin. To calculate the second concentration, the residue retained in the filter was completely eluted in methanol and redissolved in ethanol, measuring the concentration by spectrophotometry at 425 nm. Thus, a micellar solution (1 mM tween 80) prepared with $136.9 \mu\text{g mL}^{-1}$ of curcumin resulted after filtration in a solution of $127.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ loaded into the micelles. For this type of delivery system, the entrapment efficiency of curcumin into the micelles resulted to be $92.2 \pm 2.6\%$ ($n = 5$). **Table III.1.1** summarizes the physicochemical characteristics of synthesized nanocurcumin which are very appropriate for food industry.³³

Table III.1.1. Physicochemical characteristics found for curcumin nanomicelles.

Parameters	Values
Hydrodynamic size ^(a) (nm)	10.9 ± 1.9
Polydispersity index ^(a)	0.24 ± 0.03
Encapsulation efficiency ^(a) (%)	92 ± 3
Stability ^(b) (weeks)	5
Optimal pH	6

^(a) $n = 5$ synthesis, and each one is the result of three replicates.

^(b) NCur was stable at least for 5 weeks at ca. 17 – 19 °C and protected from light.

III.1.3.3. Effect of chemical variables affecting the interaction between free or nanoencapsulated curcumin and graphene quantum dots

The potential for developing a novel fluorescent probe for the discrimination between free and nanoencapsulated curcumin based on GQD systems was studied. In this context, several parameters were optimized. Suitable concentration of GQDs was established at 8 mg L⁻¹ since the maximum ratio of intensities (I_0/I) was observed.

Interaction time was evaluated from a few minutes to weeks. Time-dependence experiments were then carried out to study the stabilization time of GQDs-Cur and GQDs-NCur systems. Only 30 s under continuous stirring for homogenization and 5 min of reaction were enough to achieve a stable fluorescence signal.

The influence of pH on the system was a critical parameter to optimize owing to the low stability of curcumin at extremely acidic pH due to its presence in the protonated form and at pH above 7. The high stability of curcumin in slightly acidic medium is attributed to the conjugated diene structure, which under neutral or basic conditions is destroyed when the phenolic OH is deprotonated.³⁴ On the one hand, preliminary experiments visually corroborate such evidence as curcumin solutions remained bright yellow at pH values between 4 and 7.5 and turned into orange-red colour at pH values higher than 7.5. In addition, according to the manufacturer information, pH values higher than 8 changes the stability of the micelles. On the

other hand, it was shown that maximum fluorescence emission for GQDs occurs at pH values between 5 and 12. Taking into account all the above considerations, the pH effect among 5 and 7.5 on the free and encapsulated curcumin interaction with GQDs was studied by measurements of fluorescence intensity in the absence (I_0) and presence (I) of curcumin species. The maximum emission value was obtained for pH 6, fixed with MES hydrate buffer solution in both systems, further providing greater stability to interaction system. Therefore, this pH value was selected for the following experiments. Moreover, the effect of the ionic strength on I_0/I signal ratio of GQDs was also investigated. This experiment was carried out using MES buffer solutions (pH = 6) in the 3.2 – 30.0 mM concentration range. The results showed that the higher fluorescence quenching and emission shifting was obtained at 15 mM concentration of MES buffer. Given the low solubility of free curcumin in aqueous solutions, another parameter examined was the minimum alcohol content necessary to keep curcumin solutions stable. Therefore, the ethanolic content in the system was evaluated in the 12.5 – 35% range. Thus, higher interaction between GQDs and curcumin resulted at curcumin solutions containing 50% of ethanol, that is at 25% content in the system.

In addition, the fluorescence signal ratio was examined *inter-day* remaining constant after 7 days; after that, it was progressively decreased.

III.1.3.4. Discrimination between free and encapsulated curcumin for its interaction with graphene quantum dots

To study the feasibility of the detection system based on GQDs as fluorescence probe, emission spectra of GQDs in the absence and presence of free and nanosized curcumin were recorded. It was observed that GQD emission suffered a progressive quenching effect as function of increasing curcumin concentrations either in presence of free or nanoencapsulated media, as shown in **Figure III.1.8**. However, despite a similar quenching effect observed for both types of curcumin species, a clear difference exists between both systems. A significant red shifting in the maximum emission wavelength of GQDs when interacting with free curcumin

(Figure III.1.8a) was observed, however there is no shift in the maximum GQD emission when interacting with nanocurcumin (Figure III.1.8b).

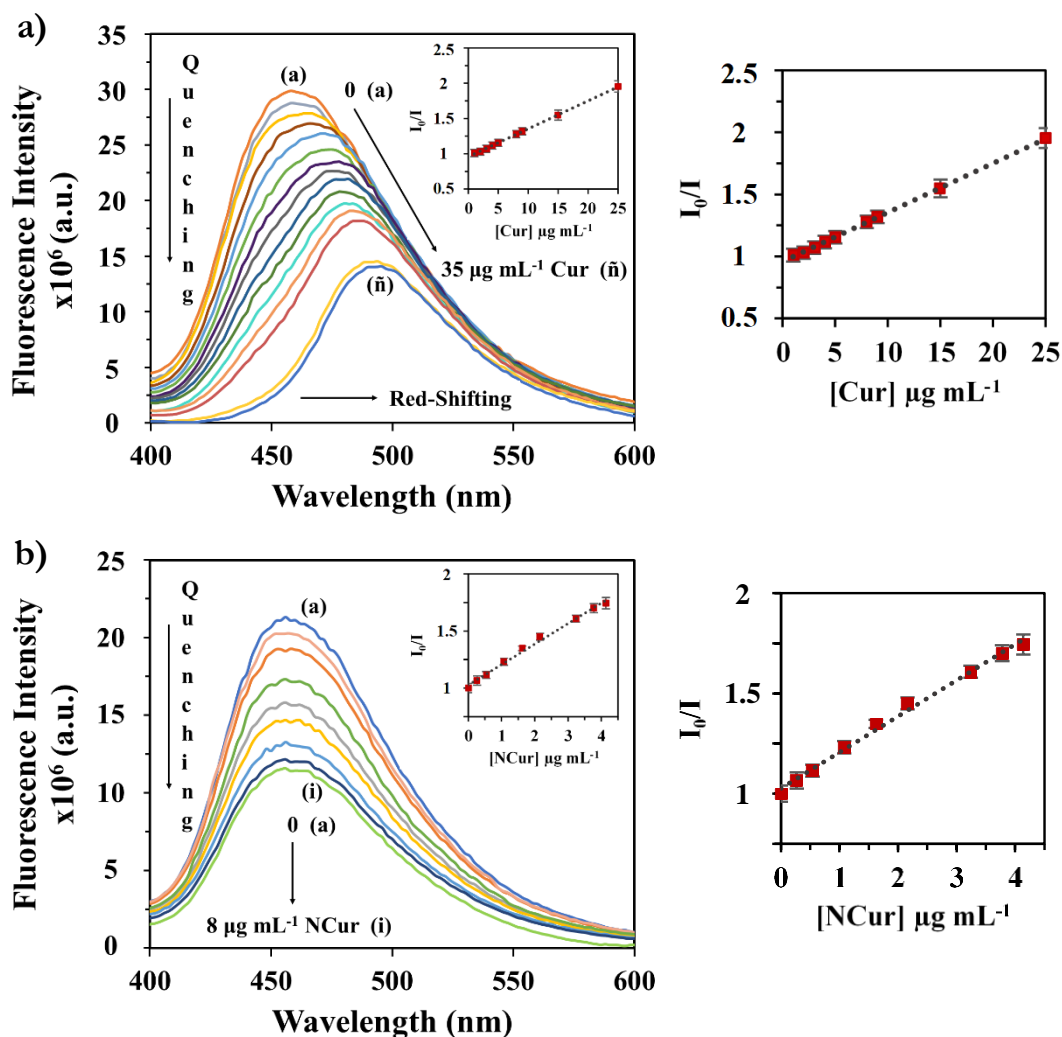


Figure III.1.8. Fluorescence emission curves of GQDs in the absence and presence of (a) Cur and (b) NCur in the concentration ranges of 1 – 35 µg mL⁻¹ and 0.3 – 8 µg mL⁻¹, respectively. Inset: linear relationships between the relative fluorescence intensity ratio and the concentration of curcumin species.

These facts let us detect curcumin and discern in which media is dispersed by monitoring the maximum emission wavelength of GQDs in presence of curcumin species, which remained constant at 458 nm in presence of NCur, and red-shifted as concentration of Cur increases.

To verify that this effect is only due to the presence of curcumin in different media, several preliminary experiments demonstrated that GQD fluorescence did not undergo any alteration in presence of empty micelles (Figure III.1.9). This result

suggests that the nanodots do not enter inside the micelles. Then, we can ensure that composition of nanosized formulation is not responsible of these effects and GQDs fluorescence is selective to free and encapsulated curcumin formulations.

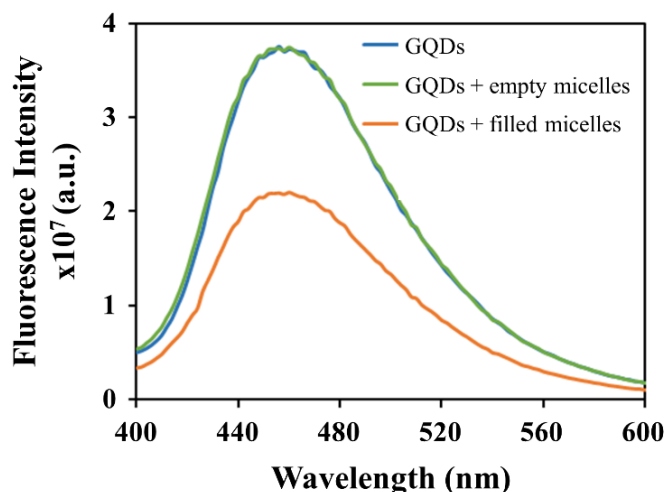


Figure III.1.9. Fluorescence emission of GQDs in the absence (blue line) and presence of empty (green line) and filled (orange line) nanomicelles. The concentration of curcumin in the micelles was $3.8 \mu\text{g mL}^{-1}$.

III.1.3.5. Interaction mechanisms

Similar quenching behaviour in the interaction of GQDs-Cur or GQDs-NCur was found although a red-shifting on the emission response is produced only for GQDs-Cur system. This fact means that graphitic layers containing functionalities may interact distinctively with both analyte environments. The most probable interaction takes place between nitrogen and oxygen-containing groups of GQDs and the keto-enol bridge of curcumin (acting as donor and acceptor of hydrogen bonds in its open conformation due to the polarity in which is found) producing an effective reduction of GQD fluorescence in both cases. In curcumin, as the keto-enol bridge saturates its donor or acceptor activity of hydrogen bonding, the hydroxyl groups of the phenolic rings become important in the interaction with GQDs. We expected that π -stacking interactions may reinforce the hydrogen bonding previously mentioned (**Figure III.1.10**). It seems that π -stacking interaction plays an important role in the red-shifting of GQD fluorescence in presence of Cur whilst such interaction did not occur in GQD-NCur system.

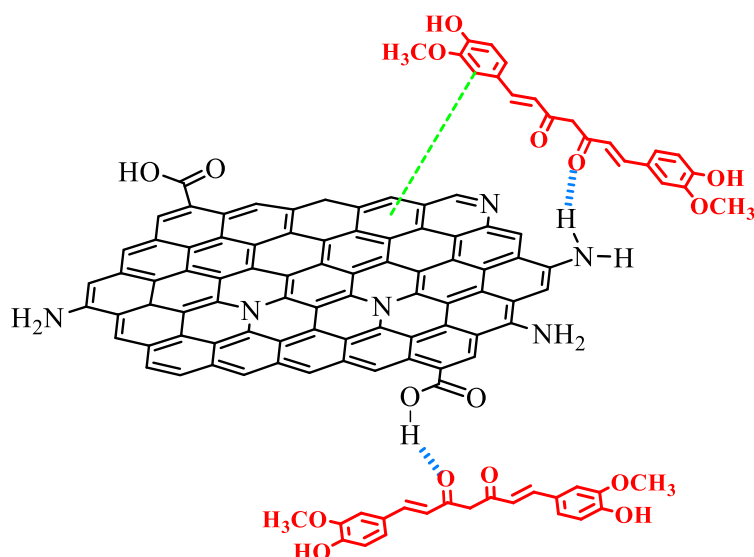


Figure III.1.10. Illustration of the expected interactions of GQDs in the presence of curcumin molecules, namely π - π stacking (in green) and hydrogen bonds (in blue).

III.1.3.6. Analytical features for the determination of free curcumin and nanocurcumin

Several analytical performance features were evaluated in order to examine the possible applicability of GQDs either free or encapsulated curcumin into nanomicelles, as fluorescent recognizing systems. Thus, a linear response was assessed by representing the analytical signal –*relative fluoresce response* I_0/I (exciting at 356 nm)– versus increasing concentrations of Cur and NCur under the optimized experimental conditions. Fluorescence intensities (I) of GQDs in presence of different concentrations of NCur were selected at the emission wavelength of 458 nm whilst the GQDs-Cur intensities were recorded at the maximum emission wavelength of the system. The quenching efficiencies followed the Stern-Volmer equation obtaining good relationships with determination coefficients higher than 0.997 in the 1 – 25 and 0.3 – 4.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ranges for Cur and NCur systems, respectively.

The precision was evaluated in terms of repeatability and reproducibility expressed as relative standard deviation (RSD). To determine the repeatability, ten analyses of samples containing 9 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of Cur or 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of NCur were carried out and RSD values of 4.0 and 3.8% were obtained, respectively. Reproducibility was assessed at same curcumin concentrations under *inter*-day conditions (for three consecutive days, $n = 30$), obtaining RSD values of 5.3 for Cur and 5.0% for NCur.

The sensitivity of the proposed method was evaluated in terms of detection (LOD) and quantification (LOQ) limits, which were established as three or ten times the standard deviation of the blank signal divided by the calibration curve slope, respectively. Interestingly, higher sensitivity resulted to be for the encapsulated curcumin since the calculated LOD values were of 0.3 and 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for Cur and NCur, respectively. LOD values were then experimentally verified.

The analytical figures of merit for both systems are summarized in **Table III.1.2**. These results demonstrated the great potential of GQDs as analytical tool for monitoring free and nanoencapsulated curcumin in different environments.

Considering the maximum permitted doses of curcumin in food by European Food Safety Authority (EFSA),³⁵ the proposed methodology is sensitive enough to quantify this compound in food samples. However, to address analyses of biological samples where curcumin content is expected to be much lower, it would probably be necessary to accompany the proposed method with preconcentration procedures. Regarding the comparison of the sensitivity of the present method with respect to others described in literature for the determination of curcumin, the obtained results were comparable to some of them as described in **Table III.1.3**. Few published analytical procedures applied to food samples showed a higher sensitivity, although the proposed method could be compensated by the possibility of discriminating between Cur and NCur. In addition, this method displays advantages in terms of low cost, simplicity, speed of the analyses and small sample volumes required in comparison to other instrumentation. It is noteworthy that this is the first analytical method proposed for the determination of NCur, since those ones described in literature related to the detection of these nanosystems always involved breaking the carrier shell to obtain Cur.

Table III.1.2. Figures of merit of the proposed analytical method for the quantification of free curcumin and nanocurcumin.

Analyte	Regression equation	Linear range ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	R^2	LOD ^(a) ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	RSD% <i>intra-day</i> ^(b)		RSD% <i>inter-day</i> ^(c)	
					Concentration	I ₀ /I	Concentration	I ₀ /I
Cur	$y = (0.96 \pm 0.004) + (0.04 \pm 0.001)x$	1.0 – 25.0	0.999	0.3	4.0	1.8	5.3	2.1
NCur	$y = (1.03 \pm 0.01) + (0.18 \pm 0.002)x$	0.3 – 4.5	0.997	0.1	3.8	0.5	5.0	0.7

^(a) LOD calculated as $3 s/A$, where s : standard deviation, A : slope of the calibration curve; ^(b) $n = 10$, for 9 and 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Cur and NCur, respectively; ^(c) $n = 30$, for 9 and 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Cur and NCur, respectively.

Table III.1.3. Analytical methods compiled in the last years for the detection of curcumin in food.

Analytical method	Linear range ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Application	Reference
Voltammetry	0.7 – 36.8	0.17	Turmeric roots	[11]
Magnetic molecularly imprinted technique combined with UV-Vis spectrophotometry	1 – 8	1.31	Food spices	[12]
Colorimetry	10 – 100	0.48	Turmeric roots	[13]
Fluorimetry	0.04 – 12.89	0.01	Food spices	[14]
High-performance liquid chromatography with ultraviolet detection	10 – 60	1.13	Turmeric roots	[16]
Fluorimetry	1 – 25	0.30	Beverages and nutraceutical formulations	This work

III.1.3.7. Interference study

To evaluate the selectivity of the proposed analytical methodology, interference studies were carried out using both types of curcumin species to investigate the effects of possible species present in nutraceutical formulations and other samples of our interest.

The study was performed by adding different amounts of the possible interfering compound to a solution containing GQDs and 2 or 9 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of encapsulated or free curcumin, respectively. Possible interfering compounds present in food, beverages and nutraceutical formulations, especially quinolone, magnesium stearate and titanium oxide, were eliminated by filtration of the samples. Other substances such as omega-3, glucose, sucrose, lactose, vitamin D and SDS and cations as K^+ , Ca^{2+} and Na^+ did not affect the analytical signal even at high concentration levels. In addition, curcuminoids namely bisdemethoxycurcumin and demethoxycurcumin, were also evaluated, being both studied when free and encapsulated into nanomicelles at two concentrations levels (at 27 and 45 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for the free curcuminoids and at 6 and 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for nanocurcuminoids). The presence of the mentioned curcuminoids produced a similar effect than curcumin on GQD emission behaviour. Since these curcuminoids are mixed with curcumin in very low proportions, the emission effects resulted to be negligible.

III.1.3.8. Analytical applications

To demonstrate the potential applicability of the proposed analytical method, ginger tea samples were fortified at four concentration levels of Cur or NCur. These samples were prepared and submitted to the analytical procedure described in “*Samples treatment and analytical procedure*” section. The matrix effect was previously evaluated to consider the possible interferences that can be exist, observing no effect on the GQDs emission due to the tea matrix. Through DLS analysis, it was found that NCur particle size was not modified when it was added to tea samples.

Figures III.1.11a and **III.1.11b** show the behaviour in the fluorescence intensity of GQDs in presence of tea samples spiked with Cur or NCur. It is observed a quenching effect in both cases and a significant shifting in the maximum emission wavelength of GQDs when interacting with Cur.

Table III.1.4 depicts the recoveries found for both curcumin species in the tea beverages analysed by triplicate which ranged from 97.7 and 103.0%. These results indicate a good agreement between the amounts added and those found in all cases.

Table III.1.4. Recoveries obtained in ginger tea samples enriched with different concentrations of free or encapsulated curcumin.

Samples	Concentration added ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentration found ^(*) ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recovery ^(*) (%)	
Ginger tea with Cur	1	5.00	2.43 ± 0.03	97.7 ± 1.0
	2	10.00	4.90 ± 0.05	97.9 ± 0.9
	3	20.00	9.83 ± 0.21	98.2 ± 2.1
	4	40.00	20.33 ± 0.46	101.5 ± 2.3
Ginger tea with NCur	1	1.50	0.74 ± 0.006	97.9 ± 0.8
	2	2.00	0.99 ± 0.004	98.2 ± 0.4
	3	2.44	1.20 ± 0.005	98.4 ± 0.4
	4	4.60	2.37 ± 0.013	103.0 ± 0.5

^(*) Analysis performed in triplicate ($n = 3$).

Furthermore, the proposed analytical method was applied to the analysis of a nutraceutical formulation of curcumin for which the supplier declares the presence of NCur. Therefore, NovaSOL-curcumin capsules contains the bioactive more bioavailable than standard curcumin extracts. This is attributed to a micellar medium in which this compound is found, being the compound perfectly stabilized and solubilized in an aqueous medium.⁸

To determine NCur in this nanoformulated product, preliminary experiments suggested that pH values in the range between 5 and 7 were necessary to maintain the same manufacturing conditions and avoid micellar destabilization of the bioactive in

the aqueous medium. By DLS it was found that the proposed treatment of the sample did not significantly change the size of the nanoparticle. Following the experimental procedure, it was demonstrated the suitability of GQDs as fluorescent sensor in the determination of NCur in the commercial sample that contains it (**Figure III.1.11c**).

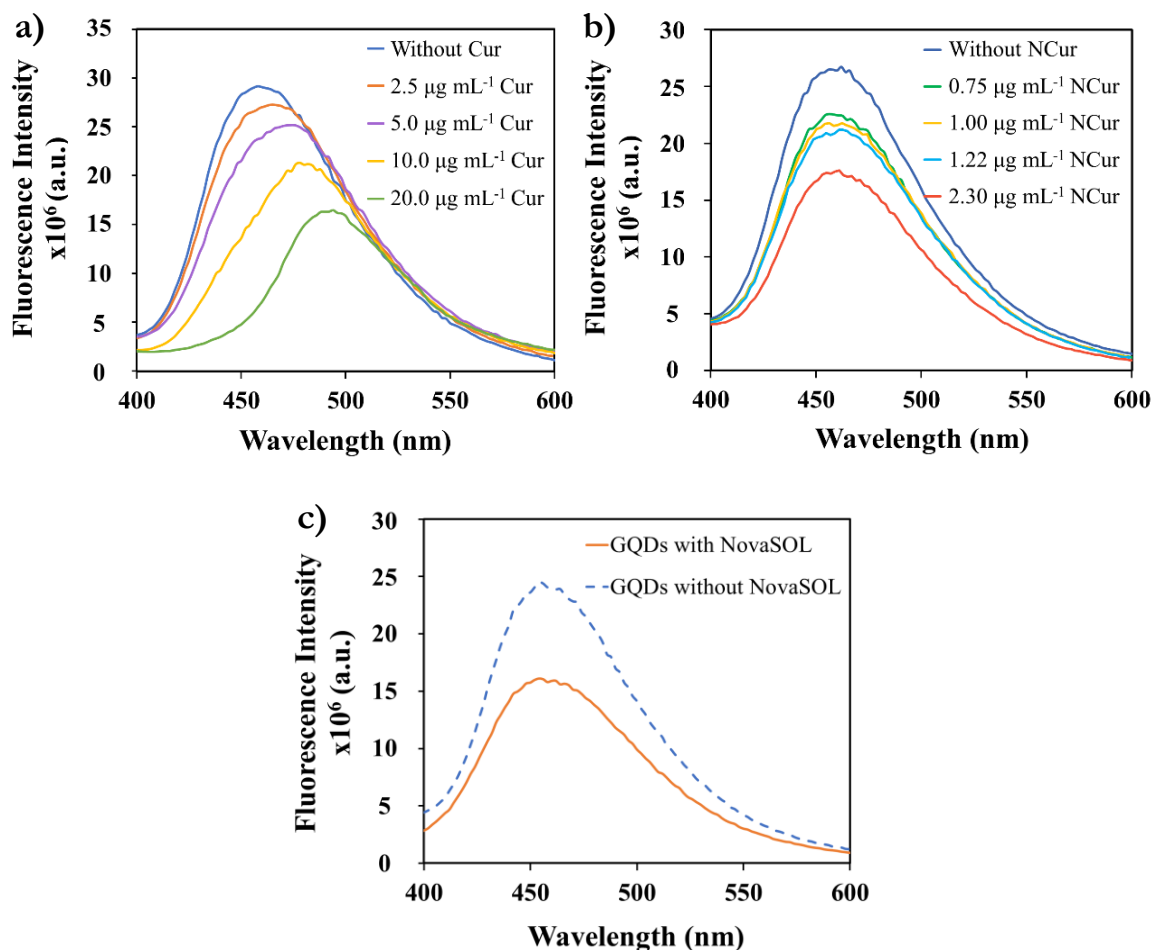


Figure III.1.11. Analyses of ginger tea samples fortified at different concentrations of (a) Cur and (b) NCur using GQDs. (c) Emission response of GQDs in presence of NovaSOL-curcumin commercial formulation containing curcumin-loaded micelles.

To evaluate the matrix effect, the determination of NCur was also carried out by standard addition method. The obtained results corresponding to the concentration of NCur found in NovaSOL samples were 26.2 ± 3.1 and 23.3 ± 2.1 g kg⁻¹ ($n = 3$) by standard addition and external calibration methods, respectively. The application of Student test t for a confidence level of 95% demonstrated the statistical coincidence between the concentrations found by both calibration procedures.

III.1.4. Conclusions

A new analytical methodology based on GQDs as a selective fluorescence probe is aimed at detecting, quantifying and discriminating between free and encapsulated curcumin. For demonstrate it, it was necessary to synthesize curcumin nanomicelles using food technology as one of the most common nanometric size formulations used in food additives and nutraceuticals. Recognition of the selected nitrogen and oxygen-containing GQDs with both types of curcumin environments is based on the existence of hydrogen bonds and π -stacking interactions which were easily monitored by recording the emission behaviour. Results demonstrated the suitability of GQDs as a promising analytical nanotool for distinguishing between different forms of the same compound present in food, which is a real-world challenge that seems to be lacking in literature. It is highlighted that both size and nature of nanocurcumin are preserved throughout the whole analytical process. The proposed method is sensitive enough to quantify curcumin in food considering the maximum permitted levels of this bioactive by EFSA. It also has advantages such as low cost, simplicity, speed and small sample volumes required. This approach opens new paths in the analysis of the nanoworld, belonging to the Third way of Analytical Nanoscience and Nanotechnology.²⁵ An interesting challenge would be to apply the method in a more complexed matrices containing both types of curcumin. Implementation with separation techniques should be investigated in the future.

Acknowledgments

This research was funded by Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO) and the Regional Government of Castilla-La Mancha (JCCM) with Grants CTQ2016-78793-P and SBPLY/17/180501/000262, respectively. E. Pinilla-Peñalver also acknowledges MINECO for the predoctoral contract BES-2017-080357. M. L. Soriano expresses her gratitude to the European Commission and the JCCM for the funding project SBPLY/17/180501/000333. We also want to thank M. A. Arranz for the AFM measurements.

References

1. Maheshwari, R. K.; Singh, A. K.; Gaddipati, J.; Srimal, R. C. Multiple biological activities of curcumin: a short review. *Life Sciences* **2006**, *78*(18), 2081-2087.
2. Lee, W.-H.; Loo, C.-Y.; Bebawy, M.; Luk, F.; Mason, R. S.; Rohanizadeh, R. Curcumin and its derivatives: their application in neuropharmacology and neuroscience in the 21st century. *Current Neuropharmacology* **2013**, *11*(4), 338-378.
3. Lee, W. H.; Loo, C. Y.; Young, P. M.; Traini, D.; Mason, R. S.; Rohanizadeh, R. Recent advances in curcumin nanoformulation for cancer therapy. *Expert Opinion on Drug Delivery* **2014**, *11*(8), 1183-1201.
4. Miller, E. D.; Dziedzic, A.; Saluk-Bijak, J.; Bijak, M. A review of various antioxidant compounds and their potential utility as complementary therapy in multiple sclerosis. *Nutrients* **2019**, *11*(7), 1528-1553.
5. Siviero, A.; Gallo, E.; Maggini, V.; Gori, L.; Mugelli, A.; Firenzuoli, F.; Vannacci, A. Curcumin, a golden spice with a low bioavailability. *Journal of Herbal Medicine* **2015**, *5*(2), 57-70.
6. Kharat, M.; Du, Z.; Zhang, G.; McClements, D. J. Physical and chemical stability of curcumin in aqueous solutions and emulsions: Impact of pH, temperature, and molecular environment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2017**, *65*(8), 1525-1532.
7. Giri, T. Bioavailability enhancement of curcumin nutraceutical through nano-delivery systems. In *Nutraceuticals*, Academic Press **2016**, pp 593-625.
8. Jamwal, R. Bioavailable curcumin formulations: A review of pharmacokinetic studies in healthy volunteers. *Journal of Integrative Medicine* **2018**, *16*(6), 367-374.
9. Sattigere, V. D.; Ramesh Kumar, P.; Prakash, V. Science-based regulatory approach for safe nutraceuticals. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2018**, *100*(14), 5079-5082.
10. Montes, C.; Villaseñor, M. J.; Ríos, Á. Analytical control of nanodelivery lipid-based systems for encapsulation of nutraceuticals: Achievements and challenges. *Trends in Food Science and Technology* **2019**, *90*, 47-62.

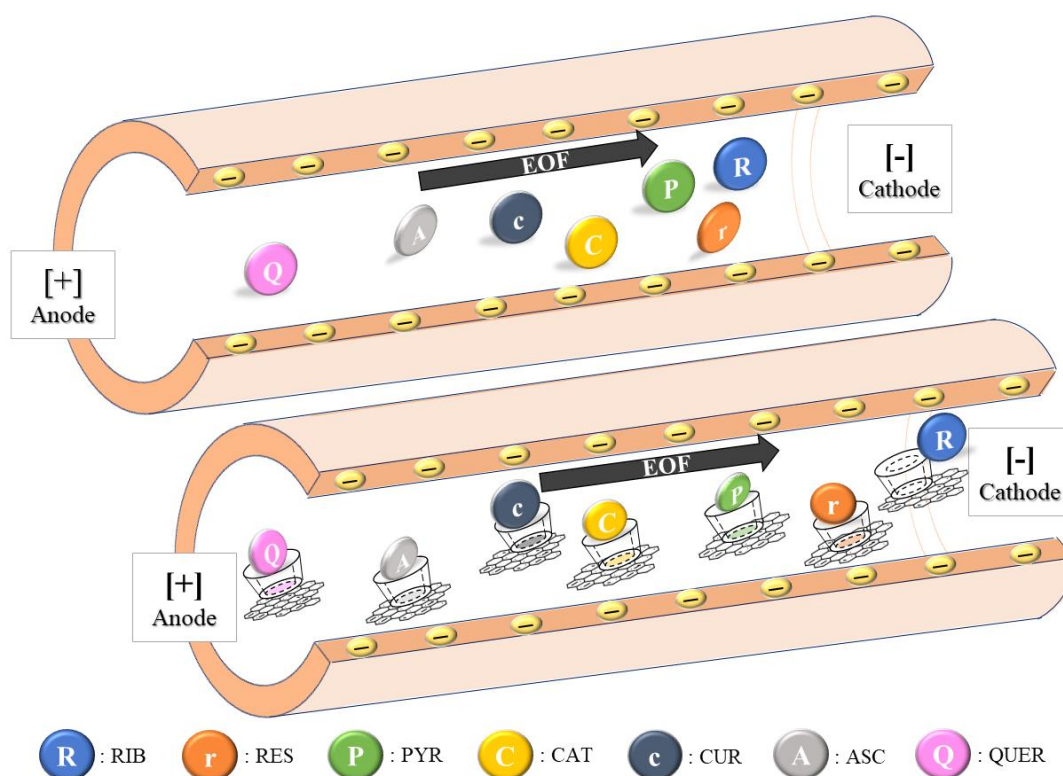
11. Chaisiwamongkhol, K.; Ngamchuea, K.; Batchelor-McAuley, C.; Compton, R. G. Multiwalled carbon nanotube modified electrodes for the adsorptive stripping voltammetric determination and quantification of curcumin in turmeric. *Electroanalysis* **2017**, *29*(4), 1049-1055.
12. Liu, X.; Zhu, L.; Gao, X.; Wang, Y.; Lu, H.; Tang, Y.; Li, J. Magnetic molecularly imprinted polymers for spectrophotometric quantification of curcumin in food. *Food Chemistry* **2016**, *202*, 309-315.
13. Wongthanyakram, J.; Harfield, A.; Masawat, P. A smart device-based digital image colorimetry for immediate and simultaneous determination of curcumin in turmeric. *Computers and Electronics in Agriculture* **2019**, *166*, 104981-104988.
14. Hu, Q.; Gao, L.; Rao, S.; Yang, Z.; Li, T.; Gong, X. Nitrogen and chlorine dual-doped carbon nanodots for determination of curcumin in food matrix via inner filter effect. *Food Chemistry* **2019**, *280*, 195-202.
15. Bu, L.; Luo, T.; Peng, H.; Li, L.; Long, D.; Peng, J.; Huang, J. One-step synthesis of N-doped carbon dots, and their applications in curcumin sensing, fluorescent inks, and super-resolution nanoscopy. *Microchimica Acta* **2019**, *186*(10), 675-686.
16. Nugroho, A.; Rohman, A.; Lukitaningsih, E.; Rakhmawati, N.; Sudjadi, S. Analysis of curcumin in ethanolic extract of *Curcuma longa* Linn. and *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. Using high performance liquid chromatography with UV-Detection. *Research Journal Phytochemistry* **2015**, *9*, 188-194.
17. Kuber, B. Method development and validation for estimation of curcumin and piperine by RP-HPLC. *International Journal of Applied Pharmaceutics* **2019**, *11*, 216-221.
18. Mazzarino, L.; Bellettini, I. C.; Minatti, E.; Lemos-Senna, E. Development and validation of a fluorimetric method to determine curcumin in lipid and polymeric nanocapsule suspensions. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* **2010**, *46*(2), 219-226.
19. Gugulothu, D. B.; Patravale, V. A new stability-indicating HPLC method for simultaneous determination of curcumin and celecoxib at single wavelength: an

- application to nanoparticulate formulation. *Pharmaceutica Analytica Acta* **2012**, 3(4), 157-163.
20. Syed, H. K.; Liew, K. B.; Loh, G. O. K.; Peh, K. K. Stability indicating HPLC–UV method for detection of curcumin in *Curcuma longa* extract and emulsion formulation. *Food Chemistry* **2015**, 170, 321-326.
21. Cayuela, A.; Soriano, M.; Carrillo-Carrion, C.; Valcarcel, M. Semiconductor and carbon-based fluorescent nanodots: the need for consistency. *Chemical Communications* **2016**, 52(7), 1311-1326.
22. Cayuela, A.; Benítez-Martínez, S.; Soriano, M. L. Carbon nanotools as sorbents and sensors of nanosized objects: the third way of analytical nanoscience and nanotechnology. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2016**, 84, 172-180.
23. Benítez-Martínez, S.; Valcárcel, M. Graphene quantum dots in analytical science. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2015**, 72, 93-113.
24. Shen, J.; Zhu, Y.; Yang, X.; Li, C. Graphene quantum dots: emergent nanolights for bioimaging, sensors, catalysis and photovoltaic devices. *Chemical Communications* **2012**, 48(31), 3686-3699.
25. Soriano, M. L.; Zougagh, M.; Valcárcel, M.; Ríos, Á. Analytical nanoscience and nanotechnology: where we are and where we are heading. *Talanta* **2018**, 177, 104-121.
26. Durán, G. M.; Benavidez, T. E.; Contento, A. M.; Ríos, A.; García, C. D. Analysis of penicillamine using Cu-modified graphene quantum dots synthesized from uric acid as single precursor. *Journal of Pharmaceutical Analysis* **2017**, 7(5), 324-331.
27. Melhuish, W. Quantum efficiencies of fluorescence of organic substances: effect of solvent and concentration of the fluorescent solute. *Journal of Physical Chemistry* **1961**, 65(2), 229-235.
28. Xia, C.; Zhu, S.; Feng, T.; Yang, M.; Yang, B. Evolution and synthesis of carbon dots: from carbon dots to carbonized polymer dots. *Advanced Science* **2019**, 6(23), 1901316-1901338.
29. Sharma, B. K. *Spectroscopy*, Goel Publishing House **1981**.

30. Joye, I. J.; Davidov-Pardo, G.; McClements, D. J. Nanotechnology for increased micronutrient bioavailability. *Trends in Food science and technology* **2014**, *40*(2), 168-182.
31. Jagannathan, R.; Abraham, P. M.; Poddar, P. Temperature-dependent spectroscopic evidences of curcumin in aqueous medium: a mechanistic study of its solubility and stability. *The Journal of Physical Chemistry B* **2012**, *116*(50), 14533-14540.
32. Ghosh, M.; Singh, A. T.; Xu, W.; Sulchek, T.; Gordon, L. I.; Ryan, R. O. Curcumin nanodisks: formulation and characterization. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2011**, *7*(2), 162-167.
33. Farhang, B. Nanotechnology and applications in food safety. In *Global Issues in Food Science and Technology*, Elsevier **2009**, pp 401-410.
34. Wang, Y. J.; Pan, M. H.; Cheng, A. L.; Lin, L. I.; Ho, Y. S.; Hsieh, C. Y.; Lin, J. K. Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **1997**, *15*(12), 1867-1876.
35. Scientific Opinion on the re-evaluation of curcumin (E 100) as a food additive. *EFSA Journal* **2010**, *8*(9), 1679-1724.

III.2. Cyclodextrin-modified graphene quantum dots as a novel additive for the selective separation of bioactive compounds by capillary electrophoresis

Microchimica Acta 2021, 188, 440-452



Schematic illustration of the electrophoretic separation of the bioactive molecules in the capillary which is filled with the running solution (top) without and (bottom) with β cd-GQDs. The fused-silica capillary with negatively ionizable silanol groups at the wall. The voltage is applied at positive polarity at the outlet.



Cyclodextrin-modified graphene quantum dots as a novel additive for the selective separation of bioactive compounds by capillary electrophoresis

Esther Pinilla-Peñalver^{1,2} · M. Laura Soriano^{1,3} · Ana M. Contento¹ · Ángel Ríos¹

Highlights

- Design and use of GQDs chemically tailored by cyclodextrin entities at the surface.
- First use of β cd-GQD conjugates as additive in CE allowing the individual exploitation of the properties of both materials (nanodot and molecular receptor).
- Simultaneous determination of several health-beneficial compounds in nutritional supplements and food.
- Those functionalized GQDs greatly improved the separation efficiency and, therefore, the selectivity of seven bioactive compounds by CE.

Abstract

A highly reliable separation and determination of various biologically active compounds was achieved using capillary electrophoresis (CE) based on β -cyclodextrin-functionalized graphene quantum dots (β cd-GQDs) as the background electrolyte additive. β cd-GQDs improve the separation efficiency between peaks of all analytes. No content of surfactants either organic solvents was needed in the running buffer containing β cd-GQDs. Up to eight consecutive runs were acquired with high precision for the separation of resveratrol, pyridoxine, riboflavin, catechin, ascorbic acid, quercetin, curcumin and even of several of their structural analogues. Baseline separation was achieved within just 13 min as a result of the effective mobility of the analytes along the capillary owing to the differential interaction with the additive. The proposed analytical method displayed a good resolution of peaks for all species selecting two absorption wavelengths in the diode array detector. Detection limits lower than $0.3 \mu\text{g mL}^{-1}$ were found for all compounds and precision values were in the range of 2.1 – 4.0% in terms of peak area of the analytes. The usefulness of the

GQDs-assisted selectivity-enhanced CE method was verified by the analysis of food and dietary supplements. The applicability to such complex matrices and the easy and low-cost GQDs preparation opens the door for routine analyses of food and natural products. The concept of using such dual approach (macromolecules and nanotechnology) has been explored to tackle the separation of various bioactive compounds in nutritional supplements and food.

Keywords

Graphitic nanostructure; Surface functionalization; Molecular receptor; Electrophoretic additive; Selectivity enhanced; Food supplements.

III.2.1. Introduction

Supramolecular chemistry is the pillar of organized interactions involving molecular organic compounds to be efficient host molecules which many promises in many areas of analytical chemistry, pharmacy and medicine amongst others.¹ The use of cyclodextrin(s) (*cd*) is very extended for accommodating certain molecules and ions inside its inner hydrophobic cavity forming inclusion complexes, especially in food and pharmacological applications. Advantages of its use relies in its versatility, low toxicity and immunogenicity producing considerably benefits of many hydrophobic or unstable molecules like nutraceuticals and drugs in aqueous media by solubility, permeability and bioavailability enhancements, masking unwanted tastes/odors or controlling drug release. In particular, from the three types of *cd*, it was found that βcd cavity is more suitable and easily accessible for many bioactive compounds like flavonoids (eg., flavonols, flavanols, flavones, flavanones), non-flavonoids (eg., stilbenes, hydroxybenzoates), natural diarylheptanoids and vitamins with medium-sized structures in contrast to insufficient inner diameter of αcd or the weaker inclusion complexation with γcd .²

Furthermore, chemically modification of nano-sized materials (NMs) with such cavitands has been explored. In fact, many works explored the advantages of the *cd* attachment onto NMs surface³ via non-covalent interactions^{4,6} whilst others

reported covalently functionalization namely by amide coupling reactions, esterifications and etherifications of the hydroxyl groups of the *cd*.⁷⁻⁹

With the appearance of the Analytical Nanoscience and Nanotechnology, the use of several NMs has been improved considerably the separation efficiency of multiple analytes.¹⁰ Although the chromatographic methods achieve high sensitivities, CE) has also a great potential in separation for its simplicity, minimal of organic waste, short analysis time, high separation efficiency and low cost. In particular, remarkable CE methods had been developed thanks to the use of NMs as additives in the buffer solution, proving an increase in the sensitivity or separation performance of multiple analytes.^{11, 12} Amongst the wide variety of nanoparticles exploited (e.g., metallic, magnetic, carbonaceous, silica), carbon-based NMs have proven to be very promising in separation techniques, reaching excellent selectivity and reproducibility of analysis.¹³ However, most carbon allotropes like nanotubes and graphene requires the use of surfactants for their good dispersibility in order to avoid aggregation inside the capillary. Novel hydrophilic carbon-based nanodots have attracted considerable attention in analytical separation by virtue of their long-term stability without the need of surfactants or organic solvents, large surface area, and easy chemical modification.¹⁴ Graphene quantum dots (GQDs) consist of a water-soluble nanolayer of graphene with quantum confinement that exhibits unique photophysical properties, demonstrating great potential as analytical tool in analytical chemistry.¹⁵ For improving GQD properties, many researchers have explored the nanolayers doping with heteroatoms¹⁶ or their functionalization with small molecules,¹⁷ like acetic acid for Cardiac Troponin I detection.¹⁸ However, to our knowledge, no reports on GQDs chemically tailored by *cd* cavitands by amidation reaction have been reported until now. The synergistic combination of the ultras-small graphitic layer with a large adsorption surface and the *cd* as excellent selector of molecules opens many analytical applications.

GQDs have been extensively used as sensing probes (optical¹⁹ or electrochemical²⁰ sensors) while they have been scarcely explored in separation techniques. Note the few analytical methods in which GQDs were explored in CE, finding one example in which such nanographene behaves as a fluorescent enhancer

for improving sensitivity of drugs²¹ and a second paper describing an improved selectivity in separation of cinnamic derivatives using GQDs as additive.²²

Nutraceuticals are food ingredients and dietary supplements containing biologically active compounds that, in addition of having a nutritional function, improve health status and prevent common diseases, being even part of therapeutic treatments.²³ In view of the growing worldwide usage associated to their health benefits, their efficacy and safety, analytical methods are required for the determination of such food components and those related compounds that nullify the beneficial effects.

Herein, a new type of functionalized GQDs with βcd was successfully prepared and characterized for the first time. In these NMs, a specific cavitand covalently linked to water-soluble graphene nanolayers was combined. To research the possibilities of βcd -GQDs as background electrolyte (BGE) additive in CE, seven health-promoter molecules were efficiently separated under optimum experimental conditions. The developed analytical method was exhaustively validated and applied to the determination of resveratrol (RES), curcumin (CUR), pyridoxine (PYR), riboflavin (RIB), ascorbic acid (ASC), catechin (CAT) and quercetin (QUER) in complex matrices as nutritional supplements and food with satisfactory results. Because in this type of samples, especially in dietary supplements, high concentrations of them are present, we focused on developing an analytical method able to detect, identify and quantify them with high selectivity, being able to distinguish their associated molecules (e.g., isomers). Therefore, it was not so much the desire to achieve a very low sensitivity, but rather that the method be highly selective and serves as the basis for the inclusion of new analytes.

III.2.2. Experimental section

III.2.2.1. Reagents and materials

All aqueous solutions were prepared with analytical grade reagents, unless otherwise stated, and deionized water purified with a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA) that reaches a resistivity of 18.2 M Ω cm at 25 °C. Uric acid ($\geq 99.0\%$) and sulfuric acid ($\geq 98.0\%$, density 1.84 g mL⁻¹) were purchased from Alfa Aesar (Kandel, Germany) and Labkem (Barcelona, Spain), respectively. *N*-hydroxysuccinimide (NHS, $\geq 98.0\%$), *N,N'*-diisopropylcarbodiimide (DIC, $\geq 98.0\%$), *N*-tert-butoxycarbonyl-ethylenediamine (Boc-EDA, $\geq 98.0\%$), triethylamine (TEA, $\geq 99.0\%$), carboxymethyl- β -cyclodextrin sodium salt (CM β -*cd*), *trans*-resveratrol (RES, $\geq 99.0\%$), pyridoxine (PYR, $\geq 98.0\%$), riboflavin (RIB, $\geq 98.0\%$), quercetin (QUER, $\geq 95.0\%$), curcumin (CUR, $\geq 98.0\%$), demethoxycurcumin (DMCUR, $\geq 95.0\%$), bisdemethoxycurcumin (BDMCUR, $\geq 95.0\%$), (+)-catechin hydrate (CAT, $\geq 98.0\%$), potassium phosphate monobasic ($\geq 99.0\%$) and sodium phosphate dibasic ($\geq 99.0\%$), sodium hydroxide ($\geq 98.0\%$), ethanol ($\geq 99.0\%$), ethyl acetate ($\geq 99.7\%$) and Kaiser test kit were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Sodium tetraborate anhydrous ($\geq 98.0\%$) was acquired from Fluka Chemie (Buchs, UK) and *L*-ascorbic acid (ASC, $\geq 99.7\%$) was supplied by PanReac (Barcelona, Spain). *Cis*-resveratrol (*cis*-RES) was obtained from the *trans*-isomer by photochemical conversion with UV light radiation.

Stock solutions of PYR, ASC (0.6 mg mL⁻¹) and RIB (0.1 mg mL⁻¹) were prepared in deionized water and those of RES, QUER, CUR and CAT (0.6 mg mL⁻¹) in ethanol. Working solutions were daily prepared by diluting stock solutions in ultrapure water. All solutions were stored in darkness at 4 °C until use.

III.2.2.2. Instrumentation

CE (G1600AX model) from Agilent (Palo Alto, CA, USA) is equipped with a diode array detector (DAD).

Absorption spectra of the analytes and the ensuing GQD aqueous solution were recorded in a UV-visible spectrophotometer (SECOMAM UVI Light XS 2),

equipped with a LabPower (V3-50) for absorbance data acquisition, along the 300 – 700 cm^{-1} spectral range. Fluorescence spectra were acquired on a QuantaMaster40 spectrofluorometer from Photon Technology International equipped with a 75 W continuous xenon short-arc lamp using a detector voltage of 981 V. SOC-10 USB interface FelixGX software was used to collect and process fluorescence data. Emission and excitation slit widths were set at 0.5 nm unless otherwise specified. All optical experiments were performed at room temperature. Dynamic light scattering (DLS) measurements were performed in a ZETASIZER nanoseries ZEN 3500 (Malvern). Fourier-transform infrared spectra (FT-IR) were acquired on a Shimadzu IR instrument, IR-Affinity-1S model with a DTGS Standard detector. Measurements of the dry materials were made in an attenuated total reflectance (ATR) crystal of ZnSe. High-resolution transmission electron microscopy (HR-TEM) images were obtained at 300 kV using a Tecnai F30 FEG TEM equipped with a windowless X-MAX Si drift detector.

Thermal gravimetric analysis (TGA) were carried out using a Setaram SDT Q600 equipment, providing signals associated with the weight changes of the GQD types.

An ultrasound bath (Selecta, Barcelona, Spain), a vortex stirrer V05 series (LBX Instruments, Madrid, Spain) with speed control and a basic 20 pH-meter with a combined glass electrode (Crison Instruments S. A., Barcelona, Spain) were used as well.

III.2.2.3. Synthesis of β -cyclodextrin modified graphene quantum dots

Carboxylated GQDs (c-GQDs) were prepared by a simple process previously described by our group¹⁹ and slightly modified. Briefly, uric acid (0.5 g) was subjected to an acidic medium (1 mL of 18.4 M H_2SO_4) under reflux conditions at 200 °C for 1h. The solution was then cooled down, neutralized and diluted up to 150 mL. The resulting solution was treated with 25 mL of a methanol:acetone mixture (1:4, v/v) and, subsequently, filtered through a 0.45- μm nylon membrane to remove all aggregates. The resulting solution displays a yellow colour.

The βcd -GQDs structure was prepared by using a modified procedure previously reported for other type of carbon-based nanostructures.⁹ Thus, in a 50 mL two-neck flask containing 57.5 mg of NHS (0.50 mmol), 77 μ L of DIC (0.50 mmol) and 11 mL of c-GQDs (0.9 mg mL⁻¹) were added under an argon flow. The mixture was stirred under inert atmosphere for 15 min. Meanwhile, 80 μ L of Boc-EDA (0.51 mmol) and 5 μ L of TEA (0.04 mmol) were mixed in a vial for 10 min and afterwards added to the previous activated GQD solution. The resultant solution was stirred for 20 h at room temperature under atmospheric conditions of argon. Once the reaction has elapsed, the suspension was filtered through a 0.45- μ m nylon membrane in a Millipore system to remove the carbamide formed as a water-insoluble by-product. The Boc-EDA modified GQDs solution was boiled for 15 min to deprotect the amines by releasing the labile Boc group. The resulting product was purified by liquid-liquid extraction for three times with ethyl acetate. The attachment of the cd moiety onto GQD surface was achieved by mixing a solution containing the aminated GQDs and 5 μ L of TEA (0.04 mmol) with CM β - cd (0.19 mmol) in presence of DIC (26 mmol) and NHS (0.26 mmol) under inert atmosphere. After 7 h of reaction at room temperature, the suspension was filtered and washed with ethyl acetate thrice. After that, the functionalization degree with amine groups was examined by analysing the oxidized, aminated and cd -functionalized GQDs with the Kaiser test.

III.2.2.4. Protocol analyses

III.2.2.4.1. Quantification of primary amines on graphene quantum dots derivatives

Kaiser test²⁴ analyses of each sample were performed in triplicate to know the content of primary amines onto GQD surface after each stage of the functionalization process. Test tubes containing 100 μ L of each GQDs type (carboxylate, amino and cd linkers) and 100 μ L of water as the blank (control) were mixed with 75 μ L of the solution containing phenol in ethanol followed by 100 μ L of that of KCN in pyridine and, finally, 75 μ L of ninhydrin in ethanol. Each test tube was heated for 7 min at 100 °C and finally, 4.8 mL of a mixture of ethanol:water (60:40, v/v) were added and

gently stirred. Absorption measurements were then recorded after homogenization. The primary amines content in GQDs structures was calculated from the equation 1:

$$[\text{amines}] = \frac{A^{570} \cdot V_f(\text{L}) \cdot 10^6}{15000 (\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}) \cdot 1 \text{ cm} \cdot W(\text{g})} \quad \text{Eq (1)}$$

where A^{570} corresponds to the absorbance at 570 nm, V_f is the final volume and W is the mass of material. The given values are expressed as μmoles of amino groups per gram of NM, being the data an average of three replicates.

III.2.2.4.2. Electrophoretic separation conditions of bioactive molecules

Separation and quantification of the bioactive compounds were performed in a CE equipment, equipped with a DAD. For this, a fused-silica capillary of 42 cm total length (33 cm effective length) and 75 μm of internal diameter (Beckman, Fullerton, CA, USA) was used.

Electrophoretic separation was carried out in the positive polarity mode applying a voltage of 10 kV at 25 °C. Detection was recorded at 278 nm for the separation of RIB, RES, PYR, CAT, ASC and QUER while for CUR was set at 425 nm. Standards and samples were injected by hydrodynamic injection mode for 8 s at 40 mbar.

Each day, the capillary was first conditioned by flushing 0.1 M NaOH for 5 min, deionized water for 5 min and, finally, the electrolyte solution for 10 min, applying 2 bars in the external pump. Between runs, the capillary was rinsed sequentially with 0.1 M NaOH (1 min), ultra-pure water (1 min), and fresh running buffer (3 min). Analyses were performed in triplicate sample and duplicate analyses and average peak areas were used for quantification. The analytes were identified not only by their migration times, but also by using enriched solutions with standards of the individual compounds.

The running buffer consists of an anhydrous sodium tetraborate aqueous solution (40 mM, pH 9.5) modified with βcd -GQDs at 52 $\mu\text{g mL}^{-1}$ as additive in the BGE. Just before use, all buffer solutions were stirred for 30 s and filtered through a 0.45- μm nylon membrane. With the same vials containing the modified BGE, it was

possible to run up to eight analyses; and after that, the BGE vials needed to be replaced by another fresh solution. Although the suspension remains stable for several days, the modified running buffer was prepared daily.

Resolution (R) of the analytes in the sample is the goal of the science of separation. The resolution is simply defined as (equation 2):

$$R = \frac{2 [(t_m)_A - (t_m)_B]}{w_A + w_B} \quad \text{Eq (2)}$$

where t_m is the migration time of the analytes and w corresponds to the baseline peak width.

III.2.2.5. Sample preparation

The chosen food supplements were *Vitax* (containing ASC, RIB and PYR, Laboratorios Ferquisa, S. A., Toledo, Spain), *BCAA powder red berries* (containing ASC and PYR, Weider Nutrition, S. L., Madrid, Spain) and *Aquilea Resveratrol* (containing RES and QUER, Laboratorios Uriach, S. L., Barcelona, Spain) which were acquired from local markets from well-known brands and pharmacies. *Vitax* capsules (1.5 g/capsule) were crushed and a portion of 1.2 g was dissolved in 100 mL of an ethanol:water (30%, v/v) mixture. The sample was next stirred by vortex to homogenise, sonicated for 1h and finally filtered through a pleated filter (a membrane of 125 mm diameter of cotton linters and cellulose fibers with 10 – 15 μm of pore size, from FILTER-LAB). The resulting solution was submitted to the electrophoretic procedure for the detection and quantification of ASC, RIB and PYR. However, due to the high amount of ASC in the sample, it was necessary to carry out a 1:50 dilution of the previous solution after the filtration step with the same solvent mixture. *BCAA powder* sample was prepared in a similar way, thus, 3.85 g were dissolved in 25 mL of the same ethanol:water extractant mixture. This sample was homogenised, sonicated for 15 min, and filtered afterwards. While for PYR quantification in the extract was directly obtained, in the case of ASC it was necessary to carry out an extra dilution (1:100) prior to injection. *Aquilea Resveratrol* dietary supplement was treated as follows: the powder content of the capsule (0.36 g/capsule) was dissolved in 50 mL of ethanol

and sonicated for 30 min. After this time, the suspension was passed through a pleated filter. Subsequently, a dilution (1:25) was prepared fixing a 30% (v/v) ethanol and the nutraceutical content in this capsules was determined using the developed electrophoretic methodology.

For the preparation of roasted cocoa samples (Ocumare de la Costa, Venezuela), the beans were crushed with a mortar to obtain a uniform powder. A portion of such powder (0.5 g) was suspended in 5 mL of a mixture of ethanol:water (30:70, v/v), sonicated for 15 min and subsequently filtered through a pleated filter. The remaining cocoa residue was again suspended with 2 mL of the extractant mixture, the suspension was sonicated and filtered again repeating this process 4 more times, so that the total volume of extractant was 13 mL. Each one of the obtained extracts was directly subjected to the CE method to estimate the CAT concentration in the sample. On the other hand, CUR determination was carried out in turmeric spices (India). Turmeric dried powder is mildly aromatic and yellowish orange. A 0.05 g portion of this powder was transferred to a 5 mL volumetric flask, making up its volume with ethanol. The mixture was sonicated for 30 min and subsequently, the suspension obtained was centrifuged for 10 min at 10,000 rpm. Once the undissolved sample portion was decanted at the bottom of the container, the supernatant was diluted (1:12, v/v) with deionized water fixing a 30% final volume of ethanol to maintain its solubility. After that, another extraction from the residual solid was carried out with 5 mL of ethanol, repeating the previous process. Finally, both extracts were separately injected to assess CUR concentration in the sample by the proposed analytical procedure.

III.2.3. Results and discussion

III.2.3.1. Choice of material

Many researchers had focused on the use of *cd* in CE as BGE additive for multiple organic molecules separation. There has been particular interest in the use of β -*cd* for their inner diameter which is suitable to establish very stable and strong host-guest interactions with a wide variety of organic guests. However, the lower solubility of β -*cd* (18.5 mg mL⁻¹) compared to α - and γ -*cd* is a disadvantage.²⁵ To solve this

limitation, a dual approach based on *cd* complexation and nanotechnology has been explored. GQDs were selected by virtue of their fascinating properties and low toxicity, ease of preparation and cheap materials and methods. Water-soluble GQDs is a suitable material to be used in CE, being chosen for easily covalently linked β -*cd*. The ensuing system based on *cd* complexation and nanotechnology displays more selective binding sites to the target analytes and offers a great potential for CE separation technique.

Thus, the surface of GQDs was chemically modified with *cd* for the first time. The first functionalization step relies on reacting the carboxyl groups at the edges of the GQD layers with Boc-EDA and after deprotection of the leaving Boc group, the second step involves the attachment of CM β -*cd* using amide coupling reactions.

III.2.3.2. Synthesis and characterization of β -cyclodextrin-coated graphene quantum dots

High-yielding one-pot synthesis of oxidized GQDs was accomplished by sulfuric acid treatment according to our previous work.¹⁹ Attachment of CM β -*cd* was achieved by a two-step reaction⁹ involving the formation of free amine superficial groups onto the GQDs nanolayers in the presence of monoprotected EDA in a first stage, followed by Boc deprotection and covalent functionalization with the macrocyclic structure via amide coupling reactions for 24 h (**Figure III.2.1a**).

To confirm the correct functionalization of the GQDs, an exhaustively physicochemical characterization was performed which indicated that the cavitand structure of β -*cd* is well preserved on the carbon-based nanodots surface after the synthesis process.

The ensuing β *cd*-GQDs were spherical-like structures of 6.8 ± 0.5 nm in diameter (**Figures III.2.1b-d** show the narrow distribution and the representative nanolayers), as examined by HR-TEM. The mean hydrodynamic size of 11.7 ± 0.8 nm ($n = 3$) was determined by DLS technique (**Figure III.2.1e**).

The importance of choosing EDA as the linker to join the cavitand and the GQDs through their carboxylic groups is the easy manner to corroborate the binding

by the quantification of free amines at GQD surface. Thus, the surface functionalities of GQDs were assessed by FT-IR spectroscopy and Kaiser test analyses ($n = 3$) of the three GQD structures containing oxygen, nitrogen groups and β -cd.

By FT-IR, the peaks assigned to the β -cd-GQD structure appeared at 3307, 2920, 1670, 1559, 1429 and 1367 cm^{-1} which are characteristic of hydrogen-bonded O-H stretching, C-H stretching, C=O and C=C stretching, C-H and O-CH in-plane bending and C-H deformation, respectively (**Figure III.2.1f**). Peaks from the cavitand, which were slightly shifted from the free one (1637, 1157, 1026, 672 cm^{-1}), appeared at 1644, 1144, 1029 and 640 cm^{-1} . In comparison to the oxidized GQDs profile, it is clear that β -cd was successfully attached to the GQD surface.

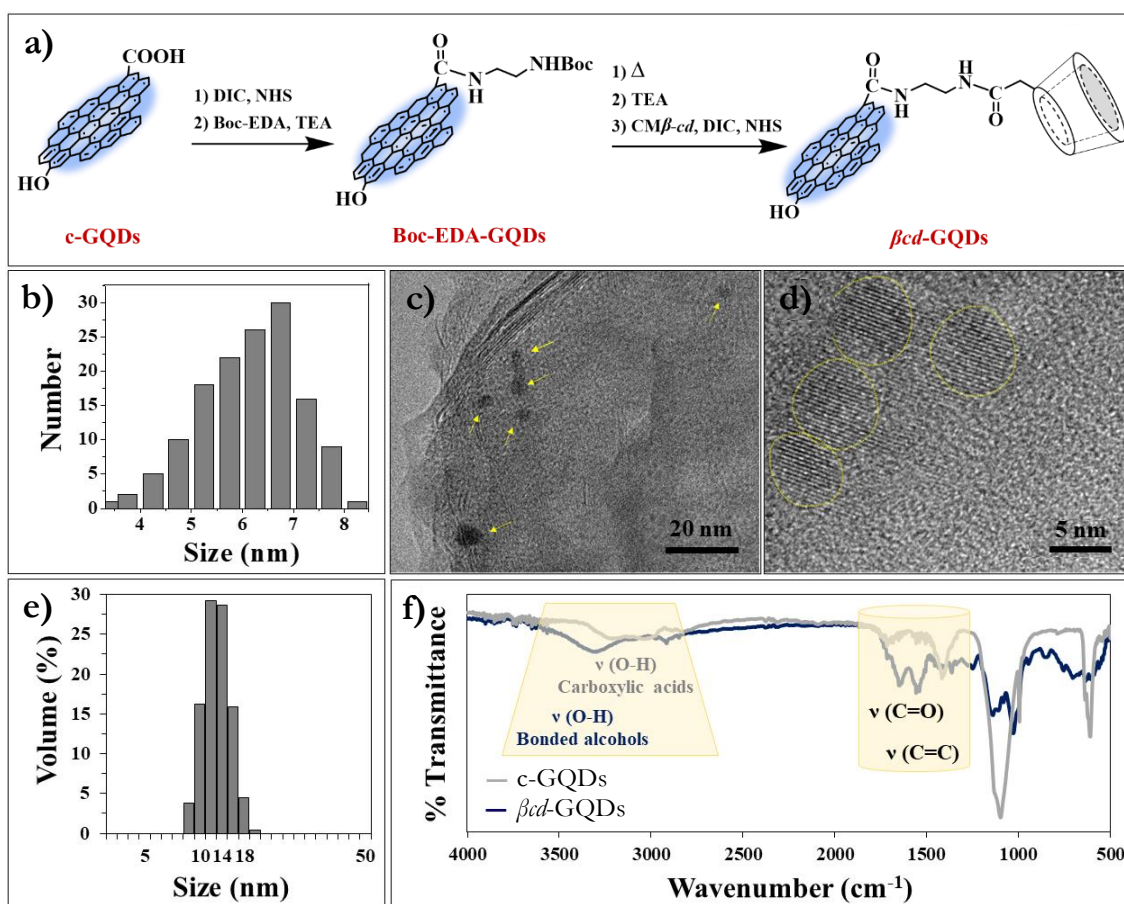


Figure III.2.1. (a) Synthetic route for the functionalization of GQDs with β -cd. (b) Size distribution and (c-d) representative HR-TEM micrographs of the ensuing β -cd-GQDs. (e) Hydrodynamic size distribution of β -cd-GQDs in aqueous media by dynamic light scattering. (f) Fourier transform infrared spectroscopy curves for the two GQD types. Notice the broad bands at around 3150 and 3307 cm^{-1} for c-GQDs (in grey) and β -cd-GQDs (in dark blue), respectively, both revealing intermolecular O-H bonding mainly from different groups.

Kaiser test results (**Table III.2.1** and **Figure III.2.2a**) confirm the incorporation of amine groups in the first functionalization step and then the successfully amidation reaction with the CM β -cd.

Table III.2.1. Primary amine content determined for carboxylated-, Boc-, amino- and β cd-GQDs by Kaiser test in triplicate.

GQD type	Amine content ($\mu\text{mol g}^{-1}$)
c-GQDs	10.54 ± 0.17
Boc-GQDs	4.60 ± 0.23
NH ₂ -GQDs	128.98 ± 0.18
β cd-GQDs	3.33 ± 0.08

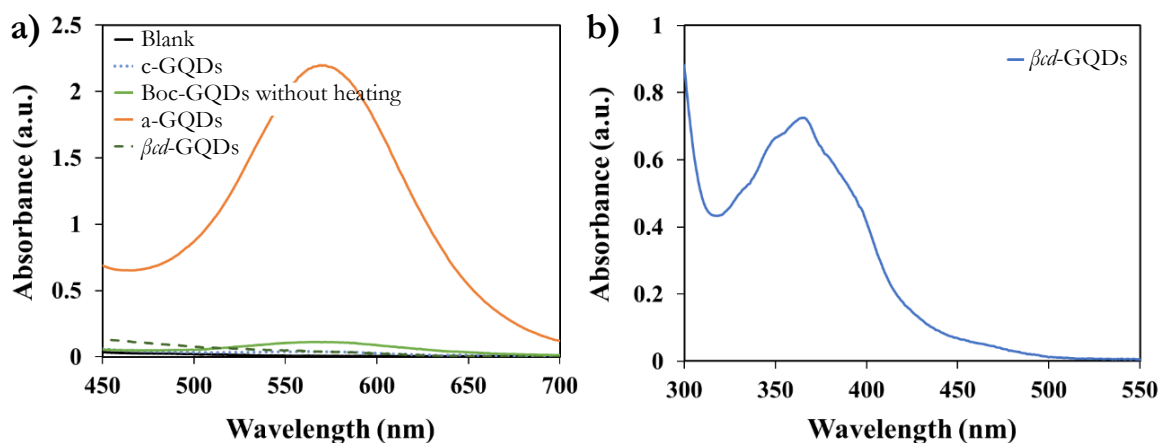


Figure III.2.2. Absorption spectra for (a) the diverse GQD structures after being subjected to Kaiser test and for (b) β cd-GQDs in aqueous solution.

Optical characterization of these nanodots was also achieved by UV-vis spectrophotometry and fluorescence techniques. A broad absorbance band centered at around 365 nm was found for both c-GQDs and β cd-GQDs (**Figure III.2.2b**) and their maximum emission (by exciting at 365 nm) appeared at 433 and 457 nm for raw and functionalized ones (see **Figure III.2.3**) as a result of a variation of the non-radiative recombination of their electronic transitions.²⁶

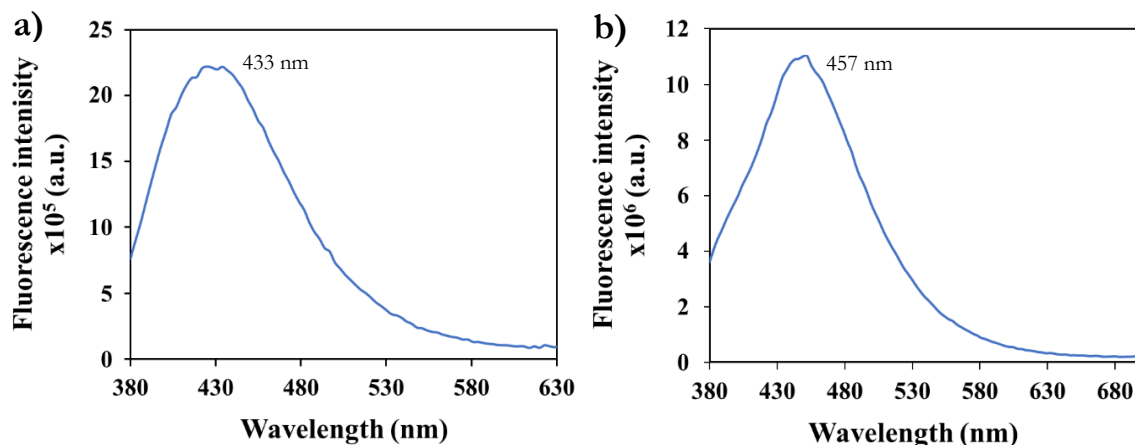


Figure III.2.3. Emission intensities of (a) β cd-GQDs and (b) c-GQDs exciting at their maximum absorption wavelength. The slit widths were set at 0.5 nm and each sample solution was located in a 1-cm quartz microcuvette under ambient conditions.

TGA is one of the useful techniques to characterize functionalized NMs after exposing them to a gradually increasing temperature under inert atmosphere for quantifying the respective weight losses. Then, thermal stabilities of c-GQDs and β cd-GQDs were examined by TGA under nitrogen flow to check the functional groups incorporated to the surface. After stabilization of the temperature at 100 °C for 20 min to remove residual water, TGA plots depicted in **Figure III.2.4** show two major steps of weight loss, being higher from the cavitand modified GQDs (22.3 and 33.8%) versus the c-GQDs (11.7 and 30.1%). Furthermore, the second derivative displays another minor step of weight loss (27.4%) at temperature above 400 °C for the case of β cd-GQDs. Thus, functionalized GQDs with *cd* is then less stable material and decomposes at lower temperatures than the carboxylated one.

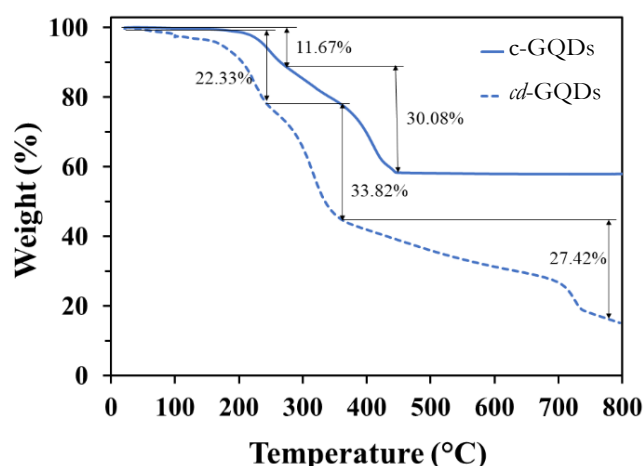


Figure III.2.4. Representative thermogravimetric profiles of carboxylated (continuous line) and β cd modified GQDs (dotted line) under nitrogen with a flow rate of 60 mL min⁻¹. Experiments required a previous stabilization period of 20 min at 100 °C, and after that, runs were carried out using a ramp of 10 °C min⁻¹ from 100 to 800 °C.

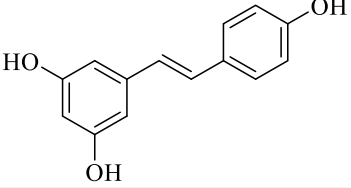
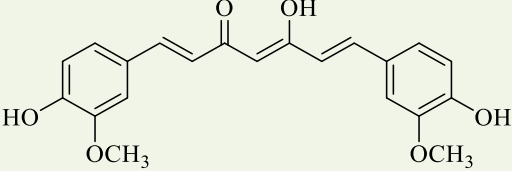
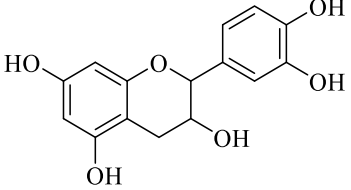
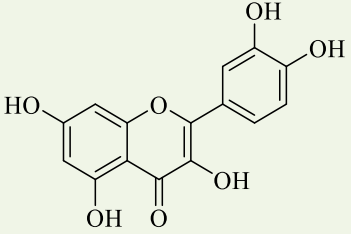
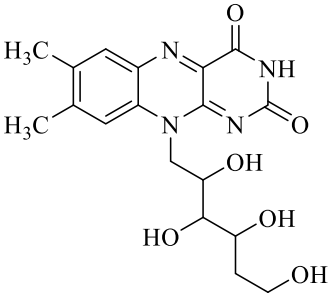
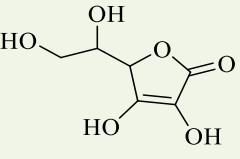
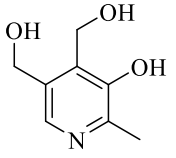
Batch-to-batch reproducibility of β cd-GQDs was also evaluated in terms of emission intensities of the resulting GQDs, resulting in 94.9% with a standard deviation of 3.1%.

III.2.3.3. Separation of the bioactive compounds by capillary electrophoresis

To avoid the extensive use of harmful additives that causes water polluting and endangers aquatic life and human health, in the developed method neither organic solvents nor organic modifiers were used. Additionally, their use in high quantities tends to have general problems of high currents in CE. Instead, it has been explored the separation of seven analytes in the absence and the presence of non-toxic GQDs with diverse surface as nanoscopic modifiers. The advantage of using water-soluble GQDs instead of the commonly used carbon nanoparticles (graphene, carbon nanotubes, nanodiamonds and fullerenes) lies in that not surfactants are required to stabilize them,^{27, 28} and thus, no bubble formation may cause an interruption in the separation process.

The influence of key parameters affecting the sensitivity and selectivity of the seven chosen bioactive compounds (RIB, RES, PYR, CAT, ASC, QUER and CUR) was evaluated to develop an effective separation method. **Table III.2.2** shows the molecular structure of the analytes and their corresponding pKa values.

Table III.2.2. Molecular structures and pKa values of the bioactive compounds.

Analyte	Molecular structure	pKa values
Resveratrol		9.2, 9.8, 10.6
Curcumin		8.3, 9.8, 10.5
Catechin		8.7, 9.7, 11.6
Quercetin		7.1, 9.1, 11.2
Riboflavin		10.2, 6.0
Ascorbic acid		4.2, 11.8
Pyridoxine		9.4, 5.6

III.2.3.3.1. Effect of pH and concentration of the running buffer

The pH of BGE is an important parameter that affects the separation of the target analytes since whether their ionization is dependent on such pH. Initially, it was evaluated the influence of the pH using a set of phosphate or borate salts buffer solutions at pH 8.5 – 10.0 with a concentration of 40 mmol L⁻¹ of the corresponding salt. This pH range was selected according to the pK_a of the analytes, being negatively charged. As shown in **Figure III.2.5a**, the BGE at pH 8.5 allows the baseline separation of only RIB, RES, ASC and QUER with good resolution, even though their peaks are not very symmetric, while PYR and CAT could not be separated, appearing as a single peak. Curiously, by increasing the pH up 9.0, the latter peak began to unfold, although no separation was achieved. Unfortunately, the migration times of RIB and RES were much closer to each other than before, turning both peaks overlap. At pH 9.5, all peaks were detected in the electropherogram although no baseline separation was observed between the first eluting analytes. More basic pH difficult the separation of the analytes and greatly increases their migration times. Thus, borate buffer solutions fixed at pH 9.5 were selected for further studies.

Secondly, the effect of ionic strength of the BGE was also investigated. The optimal ionic strength of the electrolyte should be a balance between a good peak resolution and a current not too high to minimize background noise. The effect of borate buffer concentration of BGE on the separation of the nutraceutical compounds was evaluated at concentrations ranging 10 – 50 mM at pH 9.5. **Figure III.2.5b** shows that at increasing concentrations borate salt, migration times are longer and the separation between all of them was slightly improved, although no baseline separation was achieved for all analytes in none of the cases. As can be seen from results, good resolution of CAT and ASC occurred at above 30 mM. In short, the resolution for all analytes improved at higher ionic strength up to 40 mM, while over this concentration no further improvement was observed, negatively involving higher currents and longer migration times. The latter is probably due to the fact that increasing the concentration of BGE leads to an increase in ionic strength, which results in a reduction in the thickness of the electrical double layer and a decrease in

electroosmotic fluid (EOF). This leads to an increase in the migration time of the compounds and, therefore, to a slight improvement in the separation between peaks.

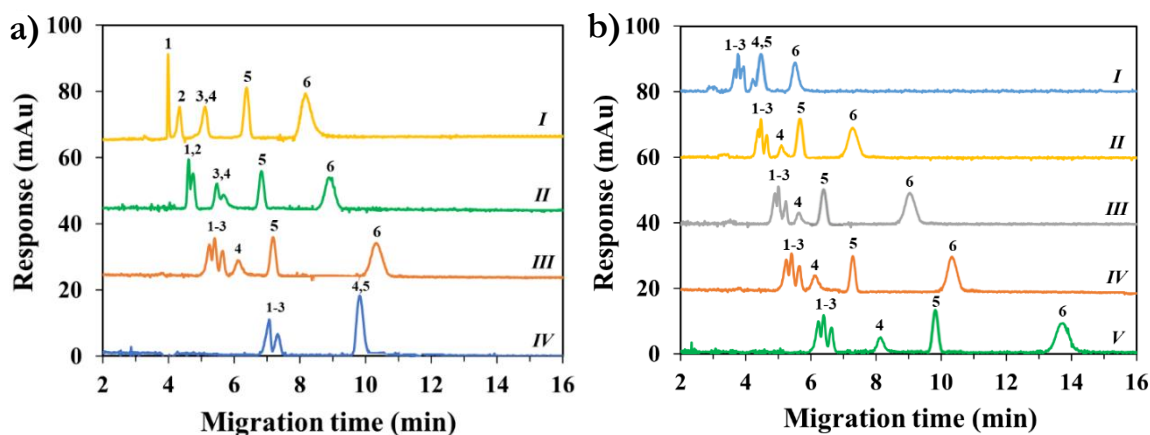


Figure III.2.5. (a) Electropherograms obtained for pH values of 8.5 (a.I), 9.0 (a.II), 9.5 (a.III) and 10.0 (a.IV) at 40 mM of borate salt. (b) Electrophoretic profiles found using 10 (b.I), 20 (b.II), 30 (b.III), 40 (b.IV) and 50 mM (b.V) of borate buffer concentration at pH 9.5. (1) Riboflavin, (2) resveratrol, (3) pyridoxine, (4) catechin, (5) ascorbic acid and (6) quercetin. Capillary column with 42 cm total length and 39 cm effective length; separation voltage of 10 kV with UV detection at 278 nm.

The best conditions found for the separation of most analytes were between 30 and 40 mM, therefore both concentrations were selected for subsequent studies. However, even under the selected separation conditions, specifically RIB, RES and PYR could not be baseline separated as shown in **Figure III.2.5b(III,IV)**. Therefore, the use of additives to the running buffer to enhance the separation are needed.

III.2.3.3.2. Effect of GQDs types as additives in the running buffer

The addition of c-GQDs and β -cd functionalized GQDs as additives in the BGE was examined at diverse concentrations.

Initially, c-GQDs were added in the BGE at concentrations from 0.25 to 1.00 mg mL⁻¹ using a set of 30 and 40 mM of borate buffer solutions at pH 9.5. Interestingly, at increasing concentrations of c-GQDs, the resolution obtained between RIB, RES and PYR peaks improved, although peak deformity was found. The best resolution was obtained using 0.75 mg mL⁻¹ of c-GQDs. The peak broadening problem observed and high currents generated could perhaps be due to

the heat emission within the capillary by the Joule effect when using such high concentrations of NM.

Next, βcd -capped GQDs were designed and added as additive to the BGE to differently influence the analytes to achieve the separation of the chosen compounds as a pseudo-stationary phase. In this case, the added amounts of βcd -GQDs into both 30- and 40-mM borate buffer solutions (at pH 9.5) were in the range of 35 – 86 $\mu g mL^{-1}$ (**Figure III.2.6**). After the addition of βcd -coated GQDs to the BGE, an improved separation between all the nutraceutical compounds was finally achieved as a result of the interactions of βcd -functionalized GQDs with the analytes. The best results in terms of peak resolution were obtained with 68 $\mu g mL^{-1}$ of the NM when using 30 mM borate buffer, while higher concentrations induced a broadening of peaks. In the case of 40 mM of borate salt, an improved resolution was found at 52 $\mu g mL^{-1}$ of βcd -GQDs.

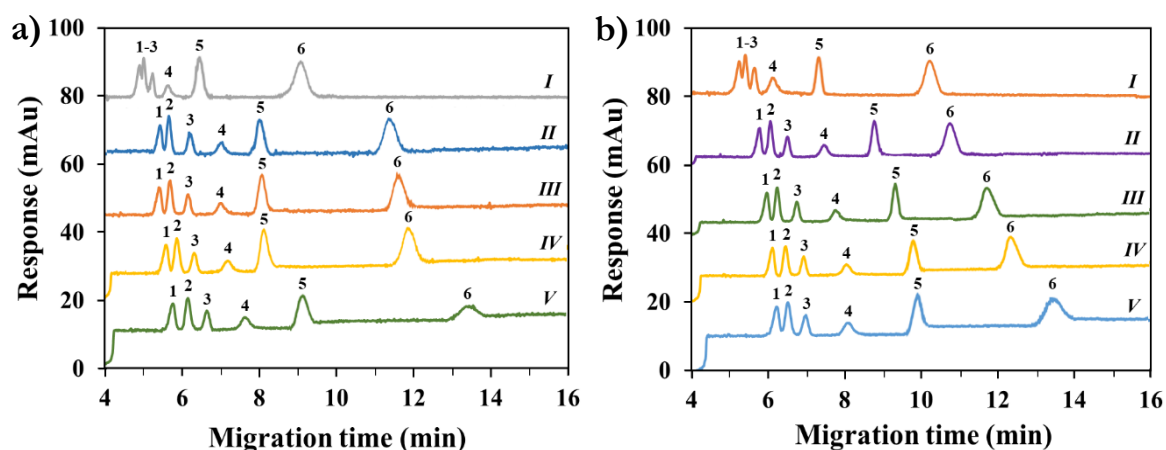


Figure III.2.6. Electropherograms found at (a) 30 mM and (b) 40 mM of borate buffer in the (I) absence and (II – V) presence of increasing concentrations of βcd -GQDs in the BGE. The concentrations of the NM are 43 (a.II), 52 (a.III), 68 (a.IV) and 86 $\mu g mL^{-1}$ (a.V) in the left graph, and 35 (b.II), 43 (b.III), 52 (b.IV) and 68 $\mu g mL^{-1}$ (b.V) in the right one. (1) Riboflavin, (2) resveratrol, (3) pyridoxine, (4) catechin, (5) ascorbic acid and (6) quercetin are the target analytes.

In view of the peak resolution found for both concentrations, it was selected 40 mM borate aqueous solution as it requires less concentration of the additive. So, it was chosen the 40 mM buffer solution modified with 52 $\mu g mL^{-1}$ βcd -GQDs as running buffer. As previously mentioned, an increase in ionic strength induces longer migration times which could provide a greater interaction between the analytes and

the stationary phase. In fact, there is a better baseline separation of the analytes when the buffer concentration is 40 mM borate instead of 30 mM (Table III.2.3). The improvement of the separation efficiency is evident by adding βcd -GQDs to the BGE. In the presence of βcd -GQDs, the resolution between peaks of RIB, RES, PYR and CAT (the closest ones without the additive) that were poor, improved up to a threefold achieving a good resolution between them (Table III.2.3b).

Table III.2.3. Resolution between peaks calculated for nutraceutical compounds containing different amounts of βcd -GQDs as additive in the (a) 30- and (b) 40-mM borate buffer solution at pH 9.5.

(a) Peak resolution	βcd -GQDs concentration in the BGE ($\mu\text{g mL}^{-1}$)				
	0	43	52	68	86
R ₁₋₂	0.55	0.74	0.94	1.07	1.54
R ₂₋₃	1.05	1.55	1.51	1.35	1.50
R ₃₋₄	1.32	2.19	2.18	2.17	2.55
R ₄₋₅	2.18	2.38	2.40	2.53	2.49
R ₅₋₆	4.31	5.31	7.11	7.08	3.41
(b) Peak resolution	βcd -GQDs concentration in the BGE ($\mu\text{g mL}^{-1}$)				
	0	35	43	52	68
R ₁₋₂	0.58	0.77	1.03	1.65	0.84
R ₂₋₃	1.02	1.32	1.53	1.78	1.37
R ₃₋₄	1.23	2.35	2.49	3.42	2.62
R ₄₋₅	2.25	2.90	3.39	4.05	2.93
R ₅₋₆	4.64	4.49	4.46	5.49	4.90

(1) Riboflavin, (2) resveratrol, (3) pyridoxine, (4) catechin, (5) ascorbic acid and (6) quercetin.

It was demonstrated that the migration time of most of the analysed compounds increased at diverse extents in the presence of GQDs functionalized with cd , resulting in good resolution between some peaks. This fact can be attributed to interactions between the analytes and the NM, which may alter the EOF by decreasing its mobility or due to an increase in the electrophoretic mobilities of the analytes. To

demonstrate what causes the observed behaviour, experiments were carried out to evaluate the effect of NM concentration on the mobility of the EOF when the other conditions remained constant. Acetone was chosen as a neutral EOF marker, and the mentioned mobility was calculated as follows (equation 3):

$$\mu_{\text{EOF}} = \frac{l \cdot L}{t_m \cdot V} \quad \text{Eq (3)}$$

where μ_{EOF} corresponds to the EOF mobility; l and L are the effective (33 cm) and total (42 cm) length of the capillary, respectively; t_m is the migration time taken by acetone to migrate from the inlet to the detection window and V is the voltage applied across the capillary column. As depicted in **Figure III.2.7**, the EOF mobility remains practically constant in the concentration range of the essayed NM. It is indicated that at pH 9.5 both βcd -GQDs and capillary wall exhibit negative charges, and therefore, due to repulsions between charges, nanoparticles are not adsorbed on the capillary wall. Thus, the presence of βcd -GQDs inside the capillary increases the electrophoretic mobility of the target analytes, decreasing their apparent mobility and increasing their migration time.

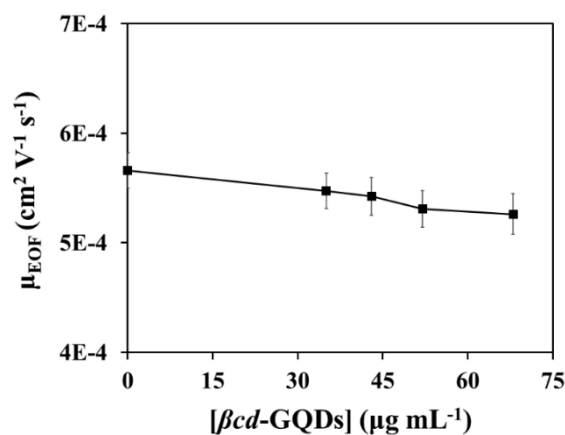


Figure III.2.7. Electroosmotic flow mobility as a function of βcd -GQDs concentration in the running buffer.

III.2.3.3.3. Influence of voltage and injection time and pressure

A range of applied voltages in nutraceutical compounds separation from 8 to 16 kV was investigated to improve peaks' resolution and minimize the analysis time. As observed in **Figure III.2.8**, electropherograms showed that migration times of all

analytes decreased when the applied voltage increased. Higher voltages produced shorter migration times and their corresponding peaks became sharper. However, if the separation voltage is too high, a much more current is generated within the capillary due to the Joule effect. This produces a widening of the peaks and a reduction in the separation efficiency. When applying more than 12 kV of voltage, it was observed that the peaks begin to widen and even RIB and RES peaks overlap. This fact also makes analyses irreproducible due to high currents produced by the heat generated inside the capillary.²⁹ Consequently, a voltage of 10 kV was selected as a compromise between migration time and separation efficiency.

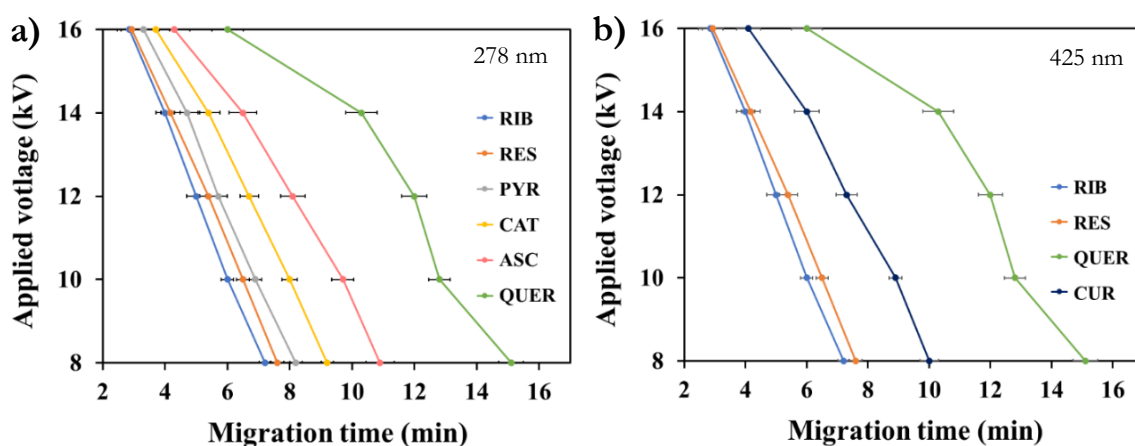


Figure III.2.8. Influence of applied voltage in the separation of the selected bioactive compounds. Signals recorded at (a) 278 and (b) 425 nm.

On the other hand, time of injection using the hydrodynamic mode was examined in an interval of 6 to 12 s. As expected, sensitivity of signals increased when longer times of injection were applied, although problems occur related to the broadening and even overlapping of peaks. For instance, no separation between RIB and RES was found above 8 s, and even, at longer injection times, above 10 s, these peaks were approaching PYR and in some cases they were overlapped. Therefore, 8 s was selected as suitable injection time. Regarding injection pressure, values ranging between 20 and 50 mbar were assayed, selecting 40 mbar of pressure to obtain the best resolution of all peaks in the shortest analysis time.

III.2.3.4. Interaction of bioactive compounds with β -cyclodextrin modified graphene quantum dots

The sufficient deep cavity of the β -*cd* is enough to accommodate most of the biologically active molecules chosen. In addition, it was found that the water-soluble β *cd*-GQD behaves as an excellent additive avoiding the use of surfactants for the binding and separation of organic compounds that contains a variety of organic moieties like five- (ASC) and six-member rings (PYR, RES and CUR) and more space-filling ones like flavanols (QUER and CAT).

Figure III.2.9 summarizes the best peak resolution attained in the absence and presence of β *cd*-GQDs ($52 \mu\text{g mL}^{-1}$). According to the structure of the analytes, their interaction with the additive is different. Thus, it is revealed from the electropherograms that apparent mobility of most of organic compounds increases at diverse extents in the presence of β *cd*-GQDs. The first three unseparated peaks in the absence of the additive were RIB, RES and PYR. Their separation is accomplished with the use of β *cd*-GQDs that interacts differently with the target analytes. In fact, it is reported that RIB interacts with β -*cd* by out-of-ring RIB-*cd* interactions,³⁰ which may suggest herein that RIB interacts weakly with the GQD layer and does not enter into the macrocycle. In contrast, the size and shape of the RES is adequate for the strong binding with the inner part of the cavity, increasing their electrophoretic mobility and allowing the perfect separation of RES and RIB by CE. PYR is also a small organic guest capable of forming stable inclusion complexes³¹ attributed to hydrogen bonds with the β -*cd* of GQDs, increasing its migration time for an efficiently separation from RES and RIB. Similar effect occurred with ASC that should be encapsulated inside the β -*cd*, attached into GQDs, as others reported³² while in the case of QUER and CAT the interactions with the inner part of the cavity is thanks to their catechol group.^{33, 34} In fact, all analytes interact with the β *cd*-GQD in different extents allowing a complete separation.

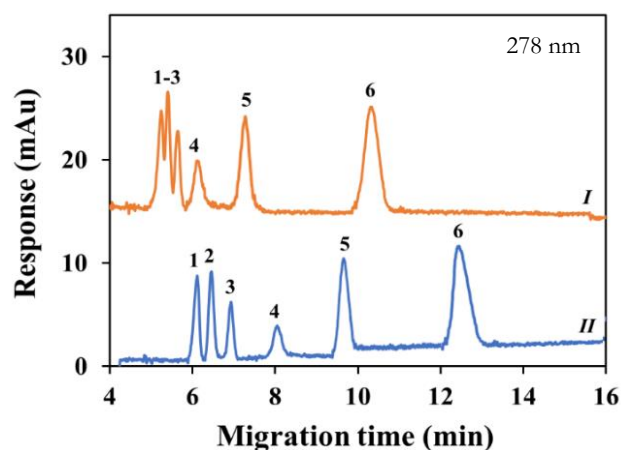


Figure III.2.9. Electrophoretic profiles of the analytes in the (I) absence and (II) presence of $52 \mu\text{g mL}^{-1}$ βcd -GQDs. (1) Riboflavin, (2) resveratrol, (3) pyridoxine, (4) catechin, (5) ascorbic acid and (6) quercetin.

III.2.3.5. Analytical performance characteristics

The analytical performance of the proposed electrophoretic method was studied in order to know its usefulness for the quantitative determination of RIB, RES, PYR, CAT, ASC, QUER and CUR. Several analytical features were evaluated under the optimized experimental conditions. The analysed nutraceutical compounds were adequately separated and quantified in less than 13 min.

External calibration curves of the compounds were constructed using peak areas as a function of their concentration and injecting each of the standard solutions in triplicate sample and duplicate analyses from 0.1 to $35.0 \mu\text{g mL}^{-1}$. A good linear relationship for all analytes was observed in the $0.5 - 25.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ range, except for QUER which was between 0.3 and $13.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ and for CUR from 0.8 to $30 \mu\text{g mL}^{-1}$. Good linearity was obtained for all cases with determination coefficients ranging between 0.994 and 0.999 .

The precision of the proposed method was assessed in terms of repeatability and reproducibility expressed as relative standard deviation (RSD). The repeatability of the electrophoretic procedure was evaluated both as function of peak area and migration time. For that, five independent injections of standard solutions were carried out sequentially at 7 and $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ for QUER and the rest of analytes, respectively. RSD values (*intra*-day conditions) were between 2.1% and 4.0% in terms

of peak area and from 1.5% to 2.2% for migration time. The high repeatability obtained indicates the stability of the analytical approach and, therefore, the reliability of the analytical method. To test the reproducibility of the measurements, the same experience was repeated over 3 days (*inter-day* conditions), obtaining RSD values ($n = 15$) lower than 4.7% and 2.8% for peak area and migration time, respectively.

The limits of detection and quantification (LOD and LOQ) for each analyte were also calculated. These statistical parameters are defined as the analyte concentration that provides a signal equivalent to the blank signal plus three and ten times its standard deviation, respectively. LOD values achieved ranged from 0.1 to 0.3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ while those of LOQ were between 0.3 and 0.8 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Once the sensitivity of the method was estimated, LOD values obtained were experimentally corroborated independently by analysing five standards prepared at the previously estimated concentration for each analyte. **Table III.2.4** summarizes the analytical performance characteristics obtained for the analysed analytes using βcd -GQDs as additives in the BGE.

The analytical features of the proposed separation method were assessed by setting the DAD at the maximum absorption of each of the analytes to achieve the highest sensitivity.

Table III.2.5 summarizes the main analytical characteristics of different electrophoretic^{11, 34-39} and chromatographic⁴⁰⁻⁴³ methods for bioactive compounds separation in food and pharmaceutical samples. Despite the high sensitivity of liquid chromatography technique, the proposed electrophoretic method offers great advantages and reaches lower LOD values for some compounds in comparison to other works that determined simultaneously coincident analytes by CE, in particular for RIB and ASC,^{11, 35, 36} PYR,^{11, 36} RES³⁸ and QUER.³⁹ Furthermore, it is worth noting the short analysis time to achieve the separation of all seven compounds. This suggests its use in routine assays in an effective and reliable way for the simultaneous determination of a wide variety of compounds in nutritional supplements and food products.

Table III.2.4. Calibration curves and validation parameters obtained according to the proposed methodology for the separation of the selected bioactive compounds.

Analyte	Linear range ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Regression equation ^(a)	R^2	$S_{y/x}$	LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	RSD% <i>intra</i> -day ($n = 5$)		RSD% <i>inter</i> -day ($n = 15$)	
						Peak area	Migration time	Peak area	Migration time
RIB	0.5 – 25.0	$y = (4.79 \pm 0.83) + (5.64 \pm 0.07)x$	0.997	1.77	0.15	4.0	1.6	4.7	2.3
RES	0.5 – 25.0	$y = (1.70 \pm 1.24) + (12.33 \pm 0.11)x$	0.999	2.94	0.13	3.6	2.2	3.7	2.4
PYR	0.5 – 25.0	$y = (2.48 \pm 0.60) + (4.61 \pm 0.05)x$	0.998	1.18	0.13	2.1	1.3	2.5	1.7
CAT	0.5 – 25.0	$y = (7.83 \pm 1.10) + (6.56 \pm 0.09)x$	0.998	2.15	0.17	2.8	1.6	3.4	1.8
ASC	0.5 – 25.0	$y = (-3.75 \pm 1.01) + (8.56 \pm 0.08)x$	0.994	2.08	0.17	2.5	1.7	3.5	1.8
QUER	0.3 – 13.0	$y = (-0.85 \pm 0.74) + (19.63 \pm 0.13)x$	0.996	1.44	0.10	3.5	1.5	4.7	1.7
CUR	0.8 – 30.0	$y = (3.21 \pm 0.69) + (4.31 \pm 0.06)x$	0.997	1.40	0.28	2.5	1.9	3.1	2.8

^(a) In the equations, y and x are the peak area and concentration of the corresponding analyte ($\mu\text{g mL}^{-1}$), respectively. Regression equations are expressed as follows: $y = (A \pm S_A) + (B \pm S_B)x$, where A: intercept, S_A : standard deviation of intercept, B: slope, S_B : standard deviation of slope, $S_{y/x}$: standard deviation of residuals, R^2 : determination coefficient and LOD: limit of detection.

Table III.2.5. Comparative table of CE separation methods of bioactive compounds coincident with those studied.

Analytes	Instrumentation	LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Analysis time (min)	Accuracy (%)	Applicability	Reference
ASC, RIB	MEKC-UV	5.0, 5.0	10	Non-specified	Dietary supplements	[35]
ASC, RIB, PYR	MEKC-UV	4.98, 0.27, 0.20	11.2	92 – 100	Food supplements	[36]
ASC, RIB, PYR	MEKC-UV	0.14, 0.10, 0.11	12	Non-specified	Energy drinks	[37]
ASC, RIB, PYR	CE-UV	8.0, 10.0, 8.0	6.2	90 – 98	Pharmaceutical formulations	[11]
RES with coincident interferers (ASC, RIB)	CE-UV	8.3	3.7	98 – 103	Nutraceuticals	[38]
CAT, QUER	CE-UV	0.05, 0.43	11	96 – 98	Chamomile and linden extracts	[39]
ASC, RIB, PYR, CAT, RES, QUER, CUR	CE-UV	0.17, 0.15, 0.13, 0.17, 0.13, 0.10, 0.28	13	97 – 104	Dietary supplements and food samples	This work
CAT, RES, QUER	LC-UV	0.008, 0.002, 0.06	24	94 – 117	Wines	[40]
RES, CUR	HPLC-UV	0.08, 0.05	4.1	98 – 99	Non-specified	[41]
RES, QUER	HPLC-UV	0.07, 0.12	19.8	97 – 100	By-products of winemaking	[42]
RES, QUER	RP-HPLC-UV	0.03, 0.03	8.5	97 – 105	Dietary supplements	[43]

ASC: ascorbic acid; **RIB:** riboflavin; **PYR:** pyridoxine; **CAT:** catechin; **RES:** *trans*-resveratrol; **QUER:** quercetin; **CUR:** curcumin; **CE-UV:** Capillary electrophoresis coupled ultraviolet detection; **MEKC-UV:** Micellar electrokinetic chromatography coupled to ultraviolet detection and **(RP)-HPLC-UV:** (Reverse-phase)-High-performance liquid chromatography coupled to ultraviolet detection.

III.2.3.6. Analytical application

The nutraceutical content of the studied compounds was determined in different dietary supplements (*BBC powder*, *Vitax* and *Aquilea Resveratrol*) as well as in other food samples such as cocoa beans or turmeric spices containing some of the analytes of interest to demonstrate the potential applicability of the proposed analytical method.

Each sample was prepared according to the procedure described in “*Sample preparation*” section and submitted to the analytical methodology detailed in “*Electrophoretic separation conditions of bioactive molecules*”. All samples were analysed in triplicate of sample in duplicate of analyses.

In case of dietary supplements, no interferences that could influence the peaks of the studied analytes were observed. The concentration of nutraceutical compounds which was estimated by external calibration, turned out to be very similar to that declared in the product labels. These results are summarized in **Table III.2.6** and their electrophoretic profiles are shown in **Figures III.2.10a-c**.

Table III.2.6. Analyses of the content of dietary supplements-containing some of the studied analytes.

Type of sample	Analyte*	Content found (mg g ⁻¹) (n = 3)	Content declared (mg g ⁻¹)
<i>BBC powder red berries</i>	PYR (3)	0.077 ± 0.004	0.074
	ASC (5)	7.80 ± 0.05	7.57
<i>Vitax</i>	RIB (1)	0.87 ± 0.01	0.93 (1.4 mg/capsule)
	PYR (3)	0.92 ± 0.01	0.93 (1.4 mg/capsule)
	ACS (5)	51.88 ± 0.92	53.33 (80 mg/capsule)
<i>Aquilea Resveratrol</i>	RES (2)	33.72 ± 1.04	33.33 (12 mg/capsule)
	QUER (6)	33.33 ± 1.45	33.33 (12 mg/capsule)

(*) The number corresponding to each analyte in the electropherograms is indicated in parenthesis.

For cocoa sample, there was no reference either information in the product regarding the amount of CAT contained, occurring the same for the turmeric spices concerning its CUR content. Therefore, standard additions were performed to compare the results obtained by another type of calibration and to evaluate the matrix effect of these samples, since a wide variety of compounds present that absorb at the recording wavelengths. Cocoa beans samples were fortified at four concentration levels of CAT standard solution between 0.052 and 0.260 mg g⁻¹ while turmeric spices were spiked with increasing concentrations of CUR in the 3 – 12 mg g⁻¹ range. The obtained concentrations of CAT for cocoa sample were 0.091 ± 0.004 mg g⁻¹ (*n* = 3) and 0.100 ± 0.005 mg g⁻¹ (*n* = 3) by external and standard addition calibration, respectively. For the case of turmeric sample, a CUR concentration of 23.8 ± 0.7 mg g⁻¹ (*n* = 3) was obtained by external calibration and by the standard addition method was of 24.9 ± 1.4 mg g⁻¹ (*n* = 3). The application of the *Student t*-test for a confidence level of 95% showed no significant differences in the concentrations obtained by both calibration methods for cocoa and turmeric samples. Once standard additions were performed, recovery values in the range of 98.0 – 103.8% were found in cocoa matrices and between 97.1 and 101.8% in turmeric spices as can be seen in **Table III.2.7**. The electropherograms corresponding to the cocoa beans and turmeric samples are depicted in **Figures III.2.10d-e**.

Table III.2.7. Found concentrations by external calibration and recoveries obtained by standard addition method for food samples-containing analytes matching those of the study.

Type of sample/ Analyte ^(a)	Sample	Added concentration (mg g ⁻¹)	Found concentration (mg g ⁻¹) (<i>n</i> = 3)	Recovery (%)
Cocoa beans/ CAT (4)	1	–	0.091 ± 0.004 ^(b) 0.100 ± 0.005 ^(c)	–
	2	0.05	0.141 ± 0.002	98.0 ± 3.2
	3	0.10	0.193 ± 0.003	98.8 ± 2.9
	4	0.16	0.252 ± 0.004	103.8 ± 2.6
	5	0.26	0.360 ± 0.010	102.9 ± 3.1
Turmeric/ CUR (7)	1	–	23.8 ± 0.7 ^(b) 24.9 ± 1.4 ^(c)	–
	2	3.0	26.7 ± 0.1	97.1 ± 3.6
	3	5.0	28.7 ± 0.2	99.4 ± 3.5
	4	9.0	32.6 ± 0.3	98.2 ± 3.3
	5	12.0	36.0 ± 0.6	101.8 ± 5.3

^(a) The number corresponding to each analyte in the electropherograms is indicated in brackets.

^(b) Found concentration obtained by external calibration.

^(c) Found concentration obtained by standard addition method.

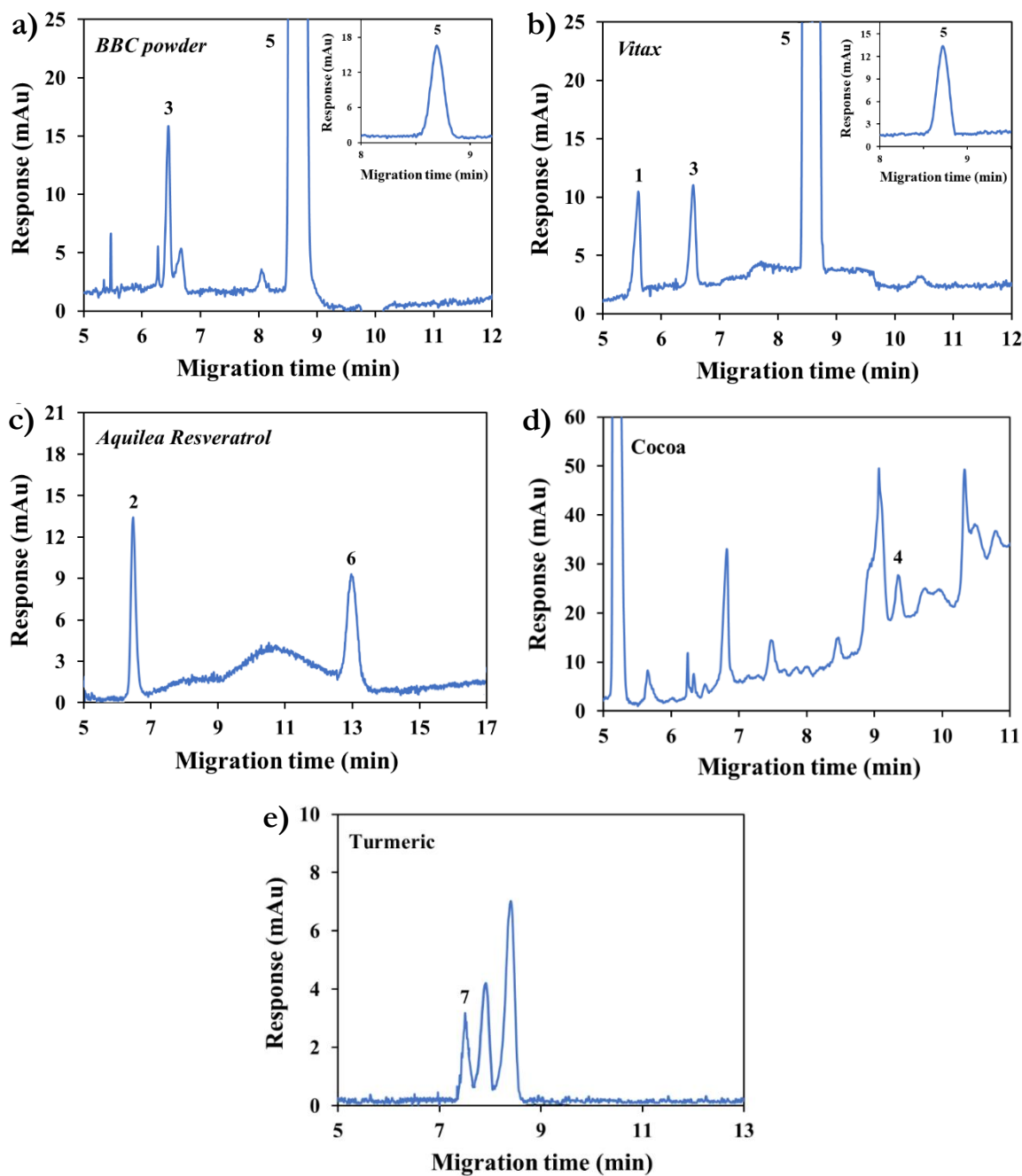


Figure III.2.10. Analyses of (a-c) nutritional supplements and (d, e) food samples containing some of the analytes. (1) Riboflavin, (2) resveratrol, (3) pyridoxine, (4) catechin, (5) ascorbic acid, (6) quercetin and (7) curcumin.

In addition, to verify the applicability of the proposed electrophoretic method, *Aquilea Resveratrol* sample, which endogenously contains RES and QUER as previously demonstrated, was doped with the other analytes, and analysed by the proposed method. In this way, the method can be applied to a sample that contains all the selected nutraceutical compounds. As shown in **Figure III.2.11**, it is clear that

a very good baseline separation was achieved for all seven analytes when the NM was used as an additive. Furthermore, other compounds from the matrix did not interfere with the peaks of the target analytes.

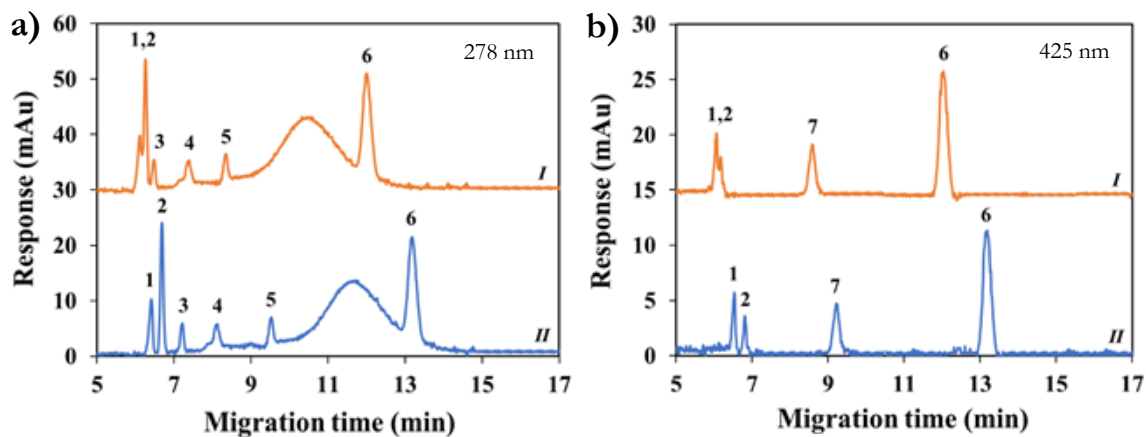


Figure III.2.11. Electrophoretic profiles corresponding to *Aquilea Resveratrol* sample containing (2) resveratrol and (6) quercetin and fortified with (1) riboflavin, (3) pyridoxine, (4) catechin, (5) ascorbic acid and (7) curcumin. Signals recorded at (a) 278 and (b) 425 nm in the (I) absence and (II) presence of β cd-GQDs.

Finally, to demonstrate the selectivity of the proposed separation method, the presence of other compounds associated with the target analytes was also evaluated. On the one hand, two additional curcuminoids, specifically DMCUR and BDMCUR, were added to a solution containing all seven nutraceuticals. On the other hand, the mentioned mixture was subjected to 365 nm light irradiation for 3 min to induce RES isomerization. In preliminary studies, it was observed in the mixture how RES was turned into the *cis*-isomer when irradiated with UV light, as found in literature.⁴⁴ Although the similar structure between the three selected curcuminoids and the two resveratrol isomers, a good resolution for all of them was achieved applying the proposed methodology (**Figure III.2.12**). With the developed separation method, all target analytes and some of their derivatives were well-identified demonstrating its suitability. For their detection, the electropherograms were recorded at two different wavelengths as function of the target analyte. These results proved the applicability of the analytical procedure for routine analysis of a wide variety of samples, quality control or their characterization.

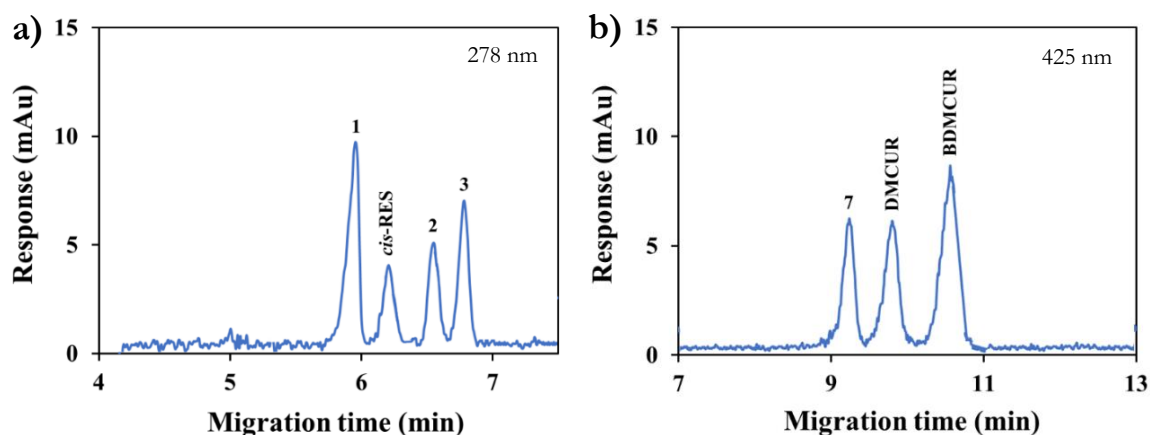


Figure III.2.12. Evaluation of the selectivity of the proposed method in commercial products containing some compounds with similar structure to the studied analytes, specifically (a) *cis*-isomer of resveratrol and (b) two curcuminoids, (demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin). (1) Riboflavin, (2) resveratrol, (3) pyridoxine and (7) curcumin.

III.2.4. Conclusions

A novel type of βcd -modified nanoparticles was designed and prepared showing unique properties, combining those typical from water-soluble GQDs as support in addition to the advantages of natural cd to form inclusion complexes. βcd -GQDs behaves as an interesting CE additive for the efficiently separation of seven health-promoter compounds (polyphenols and vitamins), decreasing their apparent mobility as a result of their interaction with the cd functionalized GQDs. It is expected that the interaction with RIB is mainly with the graphene layer while the rest of the analytes may establish a specific host-guest interaction with the linked macrocycle in different extents depending on the size and flexibility of the structure, which is the driven key to effectively separate the bioactive molecules. Thus, a simple and selective method was developed and thoroughly validated, obtaining satisfactory results that made it suitable and feasible for the routine analysis of a wide variety of compounds of biological interest. Analyses of food samples and dietary supplements were performed for the target analytes, verifying the accuracy of the results. The most remarkable aspect of this novel CE procedure is that no surfactants either organic solvents were required, neither tedious sample treatment for the simultaneous detection of such bioactive compounds, serving as the basis of screening multiple analytes in complex matrices like food.

Acknowledgments

Financial supports from the Spanish Ministry of Science and Innovation (MICINN) and from the Regional Government of Castilla-La Mancha (JCCM) (PID2019-104381GB-I00 and SBPLY/17/180501/000262, respectively) are gratefully acknowledged. Esther Pinilla-Peñalver also acknowledges MINECO for the predoctoral contract BES-2017-080357. M. Laura Soriano expresses her gratitude to the European Commission and the Regional Government of Castilla-La Mancha (JCCM) for the funding project SBPLY/17/180501/000333 (PRT program).

References

1. Steed, J. W.; Atwood, J. L. *Supramolecular chemistry*, John Wiley & Sons **2022**.
2. Fourmentin, S.; Crini, G.; Lichtfouse, E. *Cyclodextrin applications in Medicine, Food, Environment and Liquid Crystals*, Springer **2018**.
3. Gómez-Graña, S.; Pérez-Juste, J.; Hervés, P. Cyclodextrins and inorganic nanoparticles: Another tale of synergy. *Advances in Colloid and Interface Science* **2020**, *288*, 102338-102353.
4. Zhu, G.; Zhang, X.; Gai, P.; Zhang, X.; Chen, J. β -Cyclodextrin non-covalently functionalized single-walled carbon nanotubes bridged by 3, 4, 9, 10-perylene tetracarboxylic acid for ultrasensitive electrochemical sensing of 9-anthracenecarboxylic acid. *Nanoscale* **2012**, *4*(18), 5703-5709.
5. Zhang, N. M. Y.; Qi, M.; Wang, Z.; Wang, Z.; Chen, M.; Li, K.; Shum, P.; Wei, L. One-step synthesis of cyclodextrin-capped gold nanoparticles for ultra-sensitive and highly-integrated plasmonic biosensors. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2019**, *286*, 429-436.
6. Huang, Z.; Lei, J.; Ruan, H.; Gong, Y.; Wang, G.; Zhou, L. One-pot synthesis of hydroxypropyl- β -cyclodextrin capped fluorescent sulfur quantum dots for highly sensitive and selective recognition of tartrazine. *Microchemical Journal* **2021**, *164*, 106031-106037.
7. García-Valverde, M.; Soriano, M.; Lucena, R.; Cárdenas, S. Cotton fibers functionalized with β -cyclodextrins as selectivity enhancer for the direct infusion mass spectrometric determination of cocaine and methamphetamine in saliva samples. *Analytica Chimica Acta* **2020**, *1126*, 133-143.
8. Soriano, M. L.; Carrillo-Carrión, C.; Ruíz-Palomero, C.; Valcárcel, M. Cyclodextrin-modified nanodiamond for the sensitive fluorometric determination of doxorubicin in urine based on its differential affinity towards β/γ -cyclodextrins. *Microchimica Acta* **2018**, *185*(2), 1-8.

9. Cayuela, A.; Soriano, M. L.; Valcárcel, M. β -Cyclodextrin functionalized carbon quantum dots as sensors for determination of water-soluble C₆₀ fullerenes in water. *Analyst* **2016**, *141*(9), 2682-2687.
10. Soriano, M. L.; Zougagh, M.; Valcárcel, M.; Ríos, Á. Analytical Nanoscience and Nanotechnology: Where we are and where we are heading. *Talanta* **2018**, *177*, 104-121.
11. Jiménez-Soto, J. M.; Moliner-Martínez, Y.; Cárdenas, S.; Valcárcel, M. Evaluation of the performance of single-walled carbon nanohorns in capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **2010**, *31*(10), 1681-1688.
12. Gong, Z. S.; Duan, L. P.; Tang, A. N. Amino-functionalized silica nanoparticles for improved enantiomeric separation in capillary electrophoresis using carboxymethyl- β -cyclodextrin (CM- β -CD) as a chiral selector. *Microchimica Acta* **2015**, *182*(7-8), 1297-1304.
13. Kitte, S. A.; Fereja, T. H.; Halawa, M. I.; Lou, B.; Li, H.; Xu, G. Recent advances in nanomaterial-based capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **2019**, *40*(16-17), 2050-2057.
14. Cayuela, A.; Soriano, M.; Carrillo-Carrión, C.; Valcárcel, M. Semiconductor and carbon-based fluorescent nanodots: the need for consistency. *Chemical Communications* **2016**, *52*(7), 1311-1326.
15. Benítez-Martínez, S.; Valcárcel, M. Graphene quantum dots in analytical science. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2015**, *72*, 93-113.
16. Li, B.; Wang, Y.; Huang, L.; Qu, H.; Han, Z.; Wang, Y.; Kipper, M. J.; Belfiore, L. A.; Tang, J. Review of performance improvement strategies for doped graphene quantum dots for fluorescence-based sensing. *Synthetic Metals* **2021**, *276*, 116758-116778.
17. Qian, Z.; Ma, J.; Shan, X.; Shao, L.; Zhou, J.; Chen, J.; Feng, H. Surface functionalization of graphene quantum dots with small organic molecules from photoluminescence modulation to bioimaging applications: an experimental and theoretical investigation. *RSC Advances* **2013**, *3*(34), 14571-14579.

18. Lakshmanakumar, M.; Nesakumar, N.; Sethuraman, S.; Rajan, K.; Krishnan, U. M.; Rayappan, J. B. B. Functionalized graphene quantum dot interfaced electrochemical detection of cardiac Troponin I: an antibody free approach. *Scientific Reports* **2019**, *9*(1), 1-7.
19. Pinilla-Peñalver, E.; Soriano, M. L.; Durán, G. M.; Llorent-Martínez, E. J.; Contento, A. M.; Ríos, Á. Discrimination between nanocurcumin and free curcumin using graphene quantum dots as a selective fluorescence probe. *Microchimica Acta* **2020**, *187*(8), 1-11.
20. Montes, C.; Soriano, M. L.; Villaseñor, M. J.; Ríos, Á. Carbon-based nanodots as effective electrochemical sensing tools toward the simultaneous detection of bioactive compounds in complex matrices. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2020**, *878*, 114573-114583.
21. Lahouidak, S.; Soriano, M. L.; Salghi, R.; Zougagh, M.; Ríos, Á. Graphene quantum dots for enhancement of fluorimetric detection coupled to capillary electrophoresis for detection of ofloxacin. *Electrophoresis* **2019**, *40*(18-19), 2336-2341.
22. Sun, Y.; Bi, Q.; Zhang, X.; Wang, L.; Zhang, X.; Dong, S.; Zhao, L. Graphene quantum dots as additives in capillary electrophoresis for separation cinnamic acid and its derivatives. *Analytical Biochemistry* **2016**, *500*, 38-44.
23. Das, L.; Bhaumik, E.; Raychaudhuri, U.; Chakraborty, R. Role of nutraceuticals in human health. *Journal of Food Science and Technology* **2012**, *49*(2), 173-183.
24. Kaiser, E.; Colescott, R.; Bossinger, C.; Cook, P. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Analytical Biochemistry* **1970**, *34*(2), 595-598.
25. Dsouza, R. N.; Pischel, U.; Nau, W. M. Fluorescent dyes and their supramolecular host/guest complexes with macrocycles in aqueous solution. *Chemical Reviews* **2011**, *111*(12), 7941-7980.
26. Tang, J.; Zhang, J.; Zhang, Y.; Xiao, Y.; Shi, Y.; Chen, Y.; Ding, L.; Xu, W. Influence of group modification at the edges of carbon quantum dots on fluorescent emission. *Nanoscale Research Letters* **2019**, *14*(1), 1-10.

27. Takayanagi, T.; Ikeuchi, K.; Mizuguchi, H. Migration Behavior of Carbon Nanotube in Capillary Electrophoresis with Sodium Dodecyl Sulfate and Water-Soluble Nonionic Polymer. *Chromatography* **2017**, *38*, 101-106.
28. González-Curbelo, M. Á.; Varela-Martínez, D. A.; Socas-Rodríguez, B.; Hernández-Borges, J. Recent applications of nanomaterials in capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **2017**, *38*(19), 2431-2446.
29. Murtada, K.; de Andrés, F.; Ríos, A.; Zougagh, M. Determination of antidepressants in human urine extracted by magnetic multiwalled carbon nanotube poly (styrene-co-divinylbenzene) composites and separation by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **2018**, *39*(14), 1808-1815.
30. de Jesús, M. B.; Fraceto, L. F.; Martini, M. F.; Pickholz, M.; Ferreira, C. V.; de Paula, E. Non-inclusion complexes between riboflavin and cyclodextrins. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2012**, *64*(6), 832-842.
31. Attoui-Yahia, O.; Khatmi, D.; Kraim, K.; Ferkous, F. Hydrogen bonding investigation in Pyridoxine/ β -cyclodextrin complex based on QTAIM and NBO approaches. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* **2015**, *47*, 91-98.
32. Ramírez-Silva, M. T.; Palomar-Pardavé, M.; Corona-Avendaño, S.; Romero-Romo, M.; Alarcón-Angeles, G. Guest-host complex formed between ascorbic acid and β -cyclodextrin immobilized on the surface of an electrode. *Molecules* **2014**, *19*(5), 5952-5964.
33. Praveena, A.; Prabu, S.; Rajamohan, R. Encapsulation of quercetin in β -cyclodextrin and (2-hydroxypropyl)- β -cyclodextrin cavity: In-vitro cytotoxic evaluation. *Journal of Macromolecular Science, Part A* **2017**, *54*(12), 894-901.
34. Ho, S.; Thoo, Y. Y.; Young, D. J.; Siow, L. F. Inclusion complexation of catechin by β -cyclodextrins: Characterization and storage stability. *LWT-Food Science and Technology* **2017**, *86*, 555-565.
35. Serni, E.; Audino, V.; Del Carlo, S.; Manera, C.; Saccomanni, G.; Macchia, M. Determination of water-soluble vitamins in multivitamin dietary supplements and in

artichokes by micellar electrokinetic chromatography. *Natural Product Research* **2013**, 27(23), 2212-2215.

36. da Silva, D. C.; Visentainer, J. V.; de Souza, N. E.; Oliveira, C. C. Micellar electrokinetic chromatography method for determination of the ten water-soluble vitamins in food supplements. *Food Analytical Methods* **2013**, 6(6), 1592-1606.

37. Navarro-Pascual-Ahuir, M.; Lerma-García, M. J.; Simó-Alfonso, E. F.; Herrero-Martínez, J. M. Determination of water-soluble vitamins in energy and sport drinks by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Food Control* **2016**, 63, 110-116.

38. Orlandini, S.; Giannini, I.; Pinzauti, S.; Furlanetto, S. Multivariate optimisation and validation of a capillary electrophoresis method for the analysis of resveratrol in a nutraceutical. *Talanta* **2008**, 74(4), 570-577.

39. Şanlı, S.; Lunte, C. Determination of eleven flavonoids in chamomile and linden extracts by capillary electrophoresis. *Analytical Methods* **2014**, 6(11), 3858-3864.


40. Russo, P.; Andreu-Navarro, Á.; Aguilar-Caballos, M. P.; Fernández-Romero, J. M.; Gómez-Hens, A. Analytical innovations in the detection of phenolics in wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2018**, 56(6), 1858-1865.

41. Patidar, M.; Gopkumar, P.; Sridevi, G.; Behera, C.; Pillai, S. Development and validation of RP-HPLC method for simultaneous determination of resveratrol and curcumin in pure form. *Research Journal of Pharmacy and Technology* **2013**, 6(9), 990-992.

42. Careri, M.; Corradini, C.; Elviri, L.; Nicoletti, I.; Zagnoni, I. Direct HPLC analysis of quercetin and trans-resveratrol in red wine, grape, and winemaking byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2003**, 51(18), 5226-5231.

43. Omar, J. M.; Yang, H.; Li, S.; Marquardt, R. R.; Jones, P. J. Development of an improved reverse-phase high-performance liquid chromatography method for the simultaneous analyses of trans-/cis-resveratrol, quercetin, and emodin in commercial resveratrol supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2014**, 62(25), 5812-5817.

44. Rigon, R. B.; Fachinetti, N.; Severino, P.; Durazzo, A.; Lucarini, M.; Atanasov, A. G.; El Mamouni, S.; Chorilli, M.; Santini, A.; Souto, E. B. Quantification of trans-resveratrol-loaded solid lipid nanoparticles by a validated reverse-phase HPLC photodiode array. *Applied Sciences* **2019**, *9*(22), 4961-4975.



Capítulo

**Estrategias sensoras duales que
utilizan aditivos alimentarios y
nanomateriales**

En el presente capítulo se presentan dos trabajos de investigación basados en estrategias sensoras duales relacionadas con nanomateriales y aditivos alimentarios. Dichas estrategias se han centrado en la optimización y utilización de un sistema sensor que actúa de forma dual cuantificando o bien dos de los componentes que lo forman o uno de ellos y otro analito de carácter alimentario en diferentes muestras de alimentos o medioambientales. Los componentes implicados en la detección y su posterior cuantificación han sido nanomateriales y aditivos alimentarios continuando con el tipo de analitos y matrices tratadas en esta Memoria.

Así, en el subcapítulo IV.1 se detalla el desarrollo de una estrategia analítica con detección dual basada en la técnica SERS donde se determinan nanopartículas de oro en diferentes tipos de matrices, gracias a la magnificación gradual que produce dicho nanomaterial sobre la señal Raman de diferentes colorantes alimentarios. Por otra parte, este mismo nanomaterial actuó de plataforma sensora muy sensible para cuantificar el colorante que mostró la mayor respuesta SERS.

Por otro lado, el subcapítulo IV.2 recoge una metodología basada en la señal fluorescente de riboflavina la cual es utilizada como molécula sensora para la determinación de óxido de grafeno. Esta determinación es el resultado de la desactivación de la fluorescencia de dicha molécula al formarse el complejo no fluorescente riboflavina-óxido de grafeno. Por otro lado, este complejo actúa como plataforma sensora de catequina, cuya detección se basa en la recuperación gradual de la fluorescencia de riboflavina. Este último enfoque en cuanto a la detección se conoce como ensayo por desplazamiento del indicador. En esta metodología analítica, ambas determinaciones (óxido de grafeno y catequina) son llevadas a cabo mediante medidas de emisión fluorescente de riboflavina.

Mediante el planteamiento de los sensores presentados en este capítulo, se contribuye tanto a la primera como a la segunda vía de la Nanociencia y Nanotecnología Analítica de forma simultánea.

A continuación, se recoge una breve presentación de los aditivos de carácter alimentario, centrándonos en los colorantes alimentarios. Posteriormente, se continúa describiendo las características más relevantes de los aditivos protagonistas de este capítulo, como son eritrosina y riboflavina, y se finaliza presentando otro de los analitos objeto de estudio como es el compuesto bioactivo catequina.

Aditivos alimentarios

La mayoría de los productos procesados hacen uso de aditivos alimentarios los cuales garantizan el aspecto y facilitan la preparación, conservación, almacenamiento o transporte de los alimentos. Además, se utilizan para la preservación o mejora de la calidad nutricional de los alimentos,¹ los colorantes para mejorar el color del producto; los saborizantes para mejorar el sabor; los emulsionantes, estabilizantes y espesantes para mantener la textura de algunos alimentos; los antioxidantes para evitar la oxidación o cambio de color; y los conservantes con el fin de atrasar su descomposición. Los aditivos alimentarios son denominados comúnmente con la numeración *E*. Sin el uso de aditivos no podríamos alimentarnos como lo hacemos hoy en día. Sin embargo, a pesar de su uso a lo largo la historia, los aditivos siguen siendo los grandes desconocidos para los consumidores debido a la incertidumbre sobre su inocuidad, su origen, sus funciones o sobre el proceso de autorización. No obstante, el hecho de que un aditivo tenga un número *E* asignado da garantías de haber pasado controles de seguridad siendo aprobado para su uso por la Unión Europea.² El primer dígito del número *E* asignado indica la categoría a la cual pertenece el aditivo, el segundo hace referencia a la familia del aditivo y el tercero indica la especie en concreto y sirve para identificar una sustancia. Por su origen, los aditivos alimentarios se clasifican en naturales o sintéticos y dependiendo de su función se clasifican en colorantes (*E-1XX*); conservantes (*E-2XX*); antioxidantes (*E-3XX*); emulgentes, estabilizantes, espesantes y gelificantes (*E-4XX*), agentes antiaglomerantes, reguladores de la acidez, (*E-5XX*); potenciadores del sabor (*E-6XX*); agentes de recubrimiento, varios (*E-9XX*). Según el Reglamento (CE) n° 1333/2008 un aditivo alimentario se define como “toda sustancia que normalmente no se consuma como alimento en sí misma, ni tampoco se use como ingrediente básico en alimentos, tenga o no valor nutritivo, cuya adición intencionada -con un propósito tecnológico como la conservación del alimento- a un alimento durante su fabricación, transformación, preparación, tratamiento, envasado, transporte o almacenamiento tenga por efecto, o queda razonablemente prever que tenga por efecto, que el propio aditivo o sus subproductos se conviertan directa o indirectamente en un componente del alimento o bien afecte a sus características”.

Dada la importancia del aspecto de los alimentos, los colorantes tienen un papel muy importante entre los aditivos alimentarios. A lo largo de la historia, el color de los alimentos ha sido una de las características más relevantes en la evaluación de la calidad sensorial, cobrando todavía más importancia con la llegada de los alimentos procesados.³ Generalmente, se utilizan para resaltar el color natural de los alimentos, otras para devolver el color perdido tras un procesamiento industrial o para dotarle de un color más atractivo. Dependiendo de su procedencia, los colorantes pueden ser naturales, si son extraídos de una sustancia animal, vegetal o mineral (**Tabla IV.1**) y, por lo general, son parcialmente delicados e inestables; o sintéticos, si son modificados a través de procesos físicos o químicos (**Tabla IV.2**) siendo, en cambio, más estables, baratos, brillantes y ofrecen una gama de tonalidad más completa. Sin embargo, los colorantes sintéticos muestran mayores problemas de toxicidad.

Entre los colorantes sintéticos, se distinguen los colorantes azoicos y los no azoicos. Los primeros deben su coloración al grupo azo (-N=N-) conjugado con anillos aromáticos por ambos extremos. Los colorantes sintéticos se emplean en aquellos casos en los que los naturales no logran aportar suficiente color o estabilidad durante el procesamiento o almacenamiento. Surgieron a mediados del siglo XIX, cuando William Perkin sintetizó por primera vez una molécula orgánica que actuaba como pigmento, la mauveína.⁴ A partir de ahí, los colorantes de origen artificial invadieron la industria alimentaria.

Tabla IV.1. Listado de los colorantes alimentarios de origen natural de mayor interés.

Colorantes naturales	
Curcumina (E-100)	Riboflavina o lactoflavina (E-101)
Cochinilla o ácido carmínico (E-120)	Clorofilas (E-140 y 141)
Caramelo (E-150)	Carbón vegetal (E-153)
Carotenoides (E-160)	Xantofilas (E-161)
Betanina o rojo de remolacha (E-162)	Antocianos (E-163)
Carbonato cálcico (E-170)	Dióxido de titanio (E-171)
Óxidos e hidróxidos de hierro (E-172)	Aluminio (E-173)
Plata (E-174)	Oro (E-175)

Tabla IV.2. Listado de los colorantes alimentarios de origen sintético más relevantes.

Colorantes sintéticos azoicos	
Tartrazina (E-102)	Amarillo anaranjado u ocaso FCF (E-110)
Azorrubina o carmoisina (E-122)	Amaranto (E-123)
Rojo cochinilla A o ponceau 4R (E-124)	Rojo 2G (E-128)
Rojo allura AC (E-129)	Negro brillante BN (E-151)
Marrón FK (E-154)	Marrón HT (E-155)
Colorantes sintéticos no azoicos	
Amarillo de quinoleína (E-104)	Eritrosina B (E-127)
Azul patente V (E-131)	Indigotina o carmín de índigo (E-132)
Azul brillante FCF (E-133)	Verde ácido brillante BS (E-142)

A continuación, se describen brevemente las características más relevantes de los compuestos de este tipo utilizados en el Capítulo IV de la Memoria.

Eritrosina B

La eritrosina B, también llamada Ácido Rojo 57, es un compuesto organoyodado sintético y no azoico, utilizado principalmente como colorante en la industria alimentaria, comúnmente en dulces como caramelos, gelatinas, frutas en almíbar, helados y en pastelería. Es un colorante muy eficaz para teñir las guindas en conserva, ya que se fija a ellas y no destiñe. Además, este aditivo se utiliza en productos multivitamínicos y en algunos medicamentos. Su número *E* designado por el INS (Sistema de Numeración Internacional) para aditivos alimentarios es el E-127. La eritrosina es un polvo inodoro, de color pardo rojizo, con una solubilidad acuosa de aproximadamente 70 g L⁻¹ (a 25 °C y pH neutro), cuya su fórmula química es C₂₀H₆I₄Na₂O₅ y peso molecular de 879,8 g mol⁻¹. Este colorante pertenece al grupo de los xantenos cuyo nombre IUPAC es 2-(2,4,5,7-tetraiodo-6-óxido-3-oxoxanthen-9-il)benzoato de disodio (**Figura IV.1**).

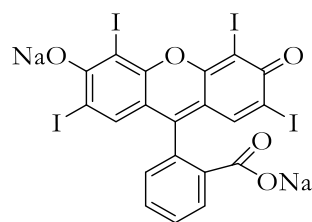


Figura IV.1. Estructura química de la molécula de eritrosina B.

La eritrosina puede ser sintetizada a partir de fluoresceína mediante una reacción de halogenación. Al ser un colorante sintético su limitación en alimentos es mayor que en el caso de los naturales, siendo considerados estos últimos, en rasgos generales, como inocuos. Incluso, en base a las regulaciones actuales, muchos colorantes sintéticos que se utilizaban anteriormente se han retirado del mercado. Según la EFSA (European Food Safety Authority) la cantidad máxima permitida para eritrosina en productos alimenticios es $\leq 200 \text{ mg kg}^{-1}$.⁵

Riboflavina (Vitamina B₂)

La riboflavina es una vitamina hidrosoluble perteneciente al grupo B, también denominada lactoflavina. La primera observación de un pigmento fluorescente en la leche con una coloración amarillo-verdosa muy intensa se remonta al científico inglés Alexander Wynter Blyth en 1872 denominándolo “lactocromo”, sin embargo, no fue hasta principios de la década de 1930 cuando esta sustancia se sintetizó y caracterizó estableciéndose el nombre de riboflavina.⁶ Sus dos coenzimas principales, el mononucleótido de flavina (FMN) y el dinucleótido de flavina y adenina (FAD) son las responsables de la actividad vitamínica en la nutrición humana.⁷

Esta vitamina participa en varios procesos de transferencia de electrones y se conoce que transfiere electrones individuales, átomos de hidrógeno e iones hidruro a un sustrato. Por ello, puede contribuir en las reacciones redox como mediador de uno o dos electrones, demostrando así que es una molécula necesaria para las reacciones enzimáticas en los sistemas biológicos.⁷

La riboflavina es un nutriente esencial para la salud humana y, normalmente, se suministra a través de la dieta.⁸ Las principales fuentes de riboflavina son los productos a base de cereales, lácteos, legumbres, carnes magras, pescado y vegetales.⁹ Su ingesta es importante para el normal crecimiento, desarrollo y funcionamiento de las células del cuerpo, ayudando en la producción de glóbulos rojos y en la liberación de energía de las proteínas.¹⁰ La cantidad diaria recomendada de esta vitamina es de 1.3 y 1.1 mg por día para hombres y mujeres, respectivamente. Un déficit en los valores de riboflavina en el organismo puede conllevar efectos adversos en la piel y en la vista.

A pesar de que disponemos de excelentes fuentes de vitamina B₂, su biodisponibilidad puede verse alterada e incluso anulada durante el procesamiento de los alimentos.¹¹ Estos y otros factores han contribuido al desarrollo de alimentos nutracéuticos a base de riboflavina como suplementos dietéticos. De esta forma, la vitamina se adiciona a niveles elevados en una matriz no alimentaria, de modo que, su ingesta en dosis superiores a las que puedan tener los alimentos que la contienen presentará mayores beneficios.¹²

La riboflavina en forma sólida es una sustancia cristalina de color amarillo-anaranjado, por lo que también es comúnmente utilizada como colorante alimentario de origen natural (*E-101*).¹³ La solubilidad acuosa que tiene esta vitamina es de 0,1 g L⁻¹, su fórmula molecular es C₁₇H₂₀N₄O₆ y su masa molecular es de 376,4 g mol⁻¹. Su estructura consta de un derivado de isoaloxazina (compuesto heterocíclico formado por un anillo bencénico, una pteridina y dos grupos carbonilo) al que se une una cadena lateral de ribitol (pentosa), siendo su nomenclatura IUPAC 7,8-dimetil-10-(2,3,4,5-tetrahidroxipentil)benzo[g]pteridina-2,4-diona (**Figura IV.2**).

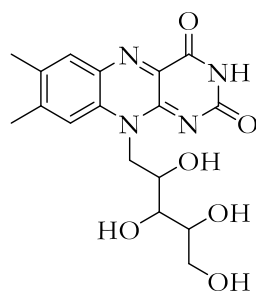


Figura IV.2. Estructura química de la molécula de riboflavina.

La riboflavina existe en tres formas diferentes dependiendo del grado de ionización en el que se encuentre en disolución acuosa. Mientras que a $\text{pH} < 0,4$ predomina la forma catiónica, a $\text{pH} > 9,75$ domina la forma aniónica, siendo predominante la forma neutra a pH comprendidos entre 0,4 y 9,75. La riboflavina en su forma catiónica no presenta fluorescencia y lo hace débilmente cuando se encuentra en su forma aniónica, sin embargo, su rendimiento cuántico aumenta considerablemente cuando se encuentra en forma neutra.¹⁴ Esta propiedad le confiere un gran potencial para actuar como cromóforo.

Catequina

Muchos son los aditivos alimentarios naturales que aún no están legislados en la UE, ya que todavía no se les ha otorgado un código *E*, pero que ya han sido investigados como potenciales alternativas a los aditivos alimentarios artificiales. En un futuro próximo, se espera empezar a ver incluidos sus nombres en las etiquetas de los alimentos, entre los que se incluyen el ácido carnisínico, el ácido ferúlico y las catequinas en la categoría de antioxidantes naturales.

La catequina es un compuesto polifenólico de origen natural que actúa como potencial antioxidante¹⁵ y como metabolito secundario en determinadas plantas. El nombre de catequina proviene de la familia de plantas *catechu* y concretamente extracto de la especie *Acacia catechu*.¹⁶ Este compuesto pertenece al grupo de los flavonoides y al subgrupo de los flavan-3-oles, o simplemente flavanoles.

La molécula de catequina cuenta con dos anillos bencénicos, conocidos como anillos A y B, y un heterociclo dihidropirano, anillo C, con un grupo hidroxilo unido al carbono 3. Mientras que el anillo A es análogo al grupo funcional del resorcinol, el anillo B lo es al grupo funcional del catecol. La fórmula química de dicha estructura es $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$, siendo su peso molecular de $290,3 \text{ g mol}^{-1}$ y cuyo nombre IUPAC es 2-(3,4-dihidroxifenil)-3,4-dihidro-2H-cromano-3,5,7-triol.

En la presente estructura existen en dos centros de quiralidad, uno de ellos se encuentra en el carbono 2 y el otro sobre el 3. Por lo tanto, la catequina posee cuatro diastereoisómeros, dos son isómeros de configuración *trans* y se denominan catequina y los otros dos son de configuración *cis* y se denominan epicatequina (**Figura IV.3**).

El isómero más común de la catequina es (+)-catequina y el más común de la epicatequina es (-)-epicatequina. Sin hacer referencia a un isómero en particular y en un sentido amplio, catequina representa a la familia química de los compuestos derivados de catequina.

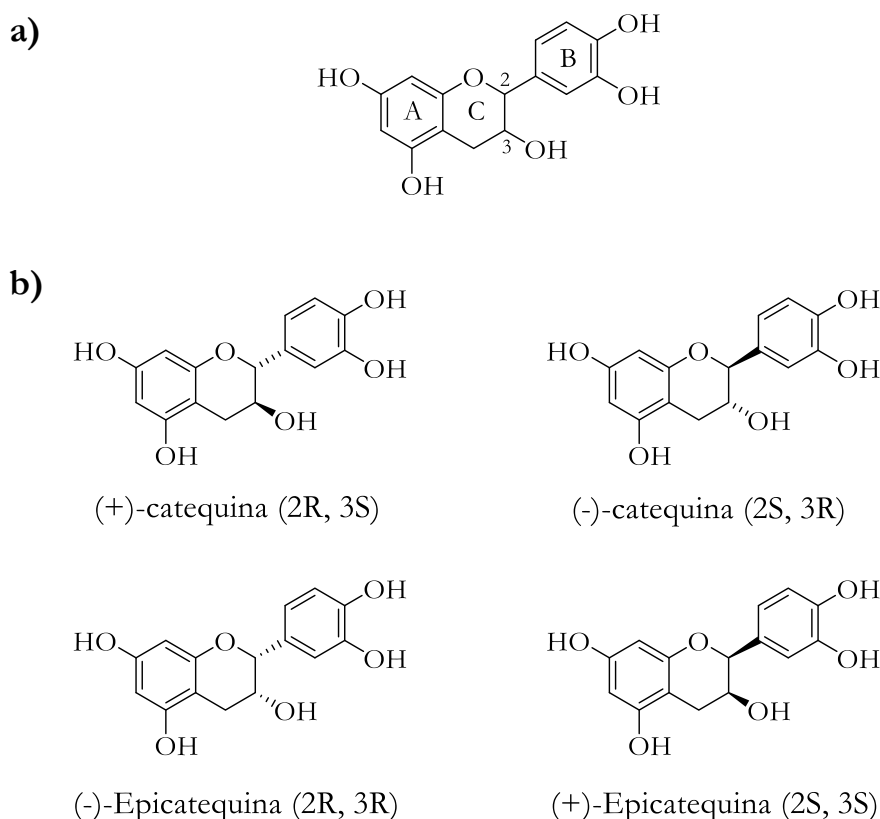


Figura IV.3. (a) Estructura química de la molécula de catequina y (b) los diastereoisómeros que presenta.

Además, existen otras estructuras dentro de la familia de las catequinas, derivadas de catequina o epicatequina, como son la (+)-galocatequina, (-)-epigalocatequina, (+)-galocatequina galato, (-)-epigalocatequina galato, (+)-catequina galato y (-)-epicatequina galato.¹⁷ Las catequinas están presentes en una gran variedad de productos dietéticos. Las principales fuentes de estos flavanoles son el té verde, chocolate, vino tinto y algunas frutas como las cerezas o albaricoques. En los alimentos, están presentes como mono-, oligo- o polímeros en niveles que van de 10 a 250 mg kg⁻¹ en frutas, incluso hasta 600 mg kg⁻¹ en el chocolate negro y desde 850 hasta 2200 mg L⁻¹ en algunas variedades de té verde.¹⁸ El sabor asociado a la (+/-)-catequina es descrito como una mezcla de astringente y algo amarga. Se ha

comprobado que mediante su encapsulación en ciclodextrinas se enmascara el sabor, pudiendo ser así empleado como aditivo.

Debido a sus efectos relacionados con la salud, las catequinas son potenciales candidatas en el área de la biomedicina. En particular, el efecto antioxidante de la (+)-catequina parece estar relacionado con su estructura química, por la presencia del catecol en el anillo B, el grupo hidroxilo activando el doble enlace del anillo C y el número total de grupos hidroxilo que presenta.¹⁹ Asimismo, las catequinas actúan frente a varios patógenos, incluidas bacterias, virus, parásitos y hongos. Sin embargo, la baja solubilidad acuosa de estos compuestos implica una limitada biodisponibilidad, siendo poco absorbidas por las barreras intestinales. Por lo tanto, es posible que se requieran algunos mecanismos de protección para mantener o incluso aumentar la estabilidad y la biodisponibilidad de estas moléculas dentro de los organismos vivos.²⁰

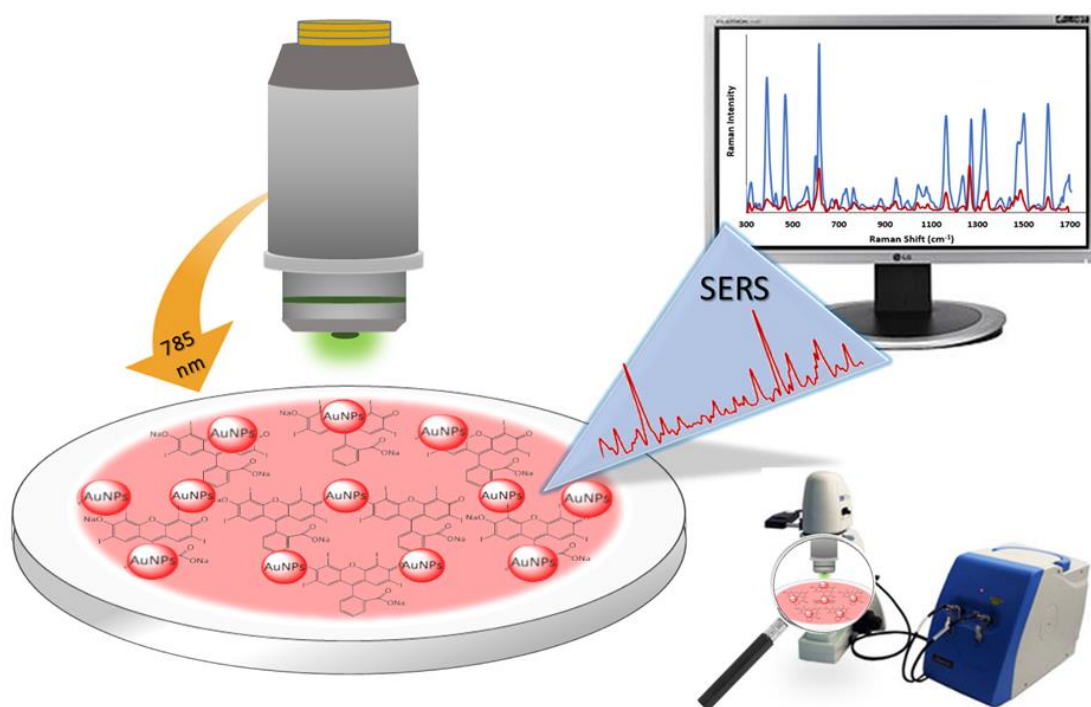
Referencias

1. Ben Said, L.; Gaudreau, H.; Dallaire, L.; Tessier, M.; Fliss, I. Bioprotective culture: A new generation of food additives for the preservation of food quality and safety. *Industrial Biotechnology* **2019**, *15*(3), 138-147.
2. Statement on a conceptual framework for the risk assessment of certain food additives re-evaluated under Commission Regulation (EU) N° 257/2010. *EFSA Journal* **2014**, *12*(6), 3697-3707.
3. Stich, E. Food color and coloring food: quality, differentiation and regulatory requirements in the European Union and the United States. In *Handbook on Natural Pigments in Food and Beverages*, Elsevier **2016**, pp 3-27.
4. Cardon, D. Polyphenols and natural dyes: a historian contemplates chemistry. In *Polyphenols*, Colloques-Inra **1998**, pp 45-80.
5. Scientific Opinion on the re-evaluation of Erythrosine (E 127) as a food additive. *EFSA Journal* **2011**, *9*(1), 1854-1899.
6. Northrop-Clewes, C. A.; Thurnham, D. I. The discovery and characterization of riboflavin. *Annals of Nutrition and Metabolism* **2012**, *61*(3), 224-230.
7. Sheraz, M. A.; Kazi, S. H.; Ahmed, S.; Anwar, Z.; Ahmad, I. Photo, thermal and chemical degradation of riboflavin. *Beilstein Journal of Organic Chemistry* **2014**, *10*(1), 1999-2012.
8. Saedisomeolia, A.; Ashoori, M. Riboflavin in human health: a review of current evidences. *Advances in Food and Nutrition Research* **2018**, *83*, 57-81.
9. Manios, Y.; Moschonis, G.; Dekkers, R.; Mavrogianni, C.; Grammatikaki, E.; van den Heuvel, E. Vitamin B2, vitamin B12 and total homocysteine status in children and their associations with dietary intake of B-vitamins from different food groups: The Healthy Growth Study. *European Journal of Nutrition* **2017**, *56*(1), 321-331.
10. Thakur, K.; Tomar, S. K.; Singh, A. K.; Mandal, S.; Arora, S. Riboflavin and health: a review of recent human research. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **2017**, *57*(17), 3650-3660.

11. Pinto, J. T.; Zempleni, J. Riboflavin. *Advances in nutrition* **2016**, 7(5), 973-975.
12. Montes, C.; Villaseñor, M. J.; Ríos, Á. Analytical control of nanodelivery lipid-based systems for encapsulation of nutraceuticals: Achievements and challenges. *Trends in Food Science and Technology* **2019**, 90, 47-62.
13. Merinas-Amo, R.; Martínez-Jurado, M.; Jurado-Güeto, S.; Alonso-Moraga, Á.; Merinas-Amo, T. Biological effects of food coloring in in vivo and in vitro model systems. *Foods* **2019**, 8(5), 176-194.
14. Drössler, P.; Holzer, W.; Penzkofer, A.; Hegemann, P. pH dependence of the absorption and emission behaviour of riboflavin in aqueous solution. *Chemical Physics* **2002**, 282(3), 429-439.
15. Zanwar, A. A.; Badole, S. L.; Shende, P. S.; Hegde, M. V.; Bodhankar, S. L. Antioxidant role of catechin in health and disease. In *Polyphenols in human health and disease*, Elsevier **2014**, pp 267-271.
16. Isemura, M. Catechin in human health and disease. *Molecules* **2019**, 24(3), 528-532.
17. Nishiumi, S.; Miyamoto, S.; Kawabata, K.; Ohnishi, K.; Mukai, R.; Murakami, A.; Ashida, H.; Terao, J. Dietary flavonoids as cancer-preventive and therapeutic biofactors. *Front Biosci* **2011**, 3(3), 1332-1362.
18. Muzolf-Panek, M.; Gliszczynska-Świgło, A.; Szymusiak, H.; Tyrakowska, B. The influence of stereochemistry on the antioxidant properties of catechin epimers. *European Food Research and Technology* **2012**, 235(6), 1001-1009.
19. Kríž, Z.; Koča, J.; Imberty, A.; Charlot, A.; Auzély-Velty, R. Investigation of the complexation of (+)-catechin by β -cyclodextrin by a combination of NMR, microcalorimetry and molecular modeling techniques. *Organic and Biomolecular Chemistry* **2003**, 1(14), 2590-2595.
20. Dos Santos, A. N.; de L Nascimento, T. R.; Gondim, B. L.; Velo, M. M.; de A Rêgo, R. I.; do C Neto, J. R.; Machado, J. R.; da Silva, M. V.; de Araujo, H. W.; Fonseca, M. G. Catechins as model bioactive compounds for biomedical applications. *Current Pharmaceutical Design* **2020**, 26(33), 4032-4047.

IV.1. Erythrosine B-coated gold nanoparticles as an analytical sensing tool for the proper determination of both compounds based on Surface-Enhanced Raman Spectroscopy

Microchemical Journal 2020, 157, 104937-104949





Erythrosine B – coated gold nanoparticles as an analytical sensing tool for the proper determination of both compounds based on surface-enhanced Raman spectroscopy



Esther Pinilla-Peñalver^{a,b}, M. Jesús Villaseñor^a, Ana M. Contento^a, Ángel Ríos^{a,*}

^a Department of Analytical Chemistry and Food Technology, University of Castilla-La Mancha, Avenue Camilo Jose Cela s/n 13004, Ciudad Real, Spain

^b Regional Institute for Applied Chemistry Research, IRICA, Avenue Camilo Jose Cela s/n 13004, Ciudad Real, Spain

Highlights

- Double SERS sensing methodology for determining AuNPs and erythrosine B.
- Erythrosine B as Raman reporter.
- Charge-transfer effect as additional enhancement mechanism.
- Highly sensitive indirect determination of AuNPs through an erythrosine-assisted SERS method.
- Contribution to analytical nanometrology.

Abstract

An analytical sensor for gold nanoparticles (AuNPs) and erythrosine B based on surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) using a specially designed nanostructured substrate is reported. It is well documented that highly conjugated organic molecules, such as food dyes, display a strong additional charge-transfer effect when adsorbed on the AuNPs metallic surface, exhibiting good abilities to act as Raman reporters. In this work, five synthetic food dyes were selected and studied as AuNPs sensor molecules. Erythrosine B showed the highest AuNPs-binding affinity due to its greater enhancement of the Raman signal with respect to the other dyes tested. Thus, this dye was selected to be part of the sensor. This fact allowed the development of an analytical sensor for both AuNPs and erythrosine B. The optimal performance conditions of the sensor for both analytes were studied, showing to be especially sensitive for the determination of AuNPs. A linear relationship exists between the SERS signal intensity and AuNPs in the 1.0 to 12.0 ng L⁻¹ range and

between 5.0 and 150.0 $\mu\text{g L}^{-1}$ for erythrosine. Detection limits (LODs) were 0.3 ng L^{-1} and 1.4 $\mu\text{g L}^{-1}$ for AuNPs and erythrosine B, respectively. The potential of this analytical method was demonstrated by applying it to the quantification of AuNPs in enriched environmental, biological and cosmetic samples, and of erythrosine B in food samples. The proposed analytical approach satisfies the need for a simple, quick and sensitive methodology to determine AuNPs in samples of interest, thus contributing to analytical nanometrology.

Keywords

Gold nanoparticles; Surface-enhanced Raman spectroscopy; Food dyes; Erythrosine B; Agri-food samples; Charge-transfer mechanism.

IV.1.1. Introduction

In recent years, Nanotechnology is a continuously expanding area that is arousing great interest in the analytical community. In fact, many nanoparticles (NPs) are used in a wide range of products, including cosmetics, medicines, food and packaging, paints, coatings, electronic products or catalysts. That is why every time living beings and the environment are more exposed to this type of materials, which generates some concern for the possible environmental and biological impact. Hence the interest in knowing the potential risks and negative impacts of NPs in the different media and samples, as well as having or developing reliable analytical methods to detect the presence of NPs (including their proper characterization) and knowing the levels at which they are present. Recently the term “nano analytical metrology” has been introduced,¹ covering both sides related to nanomaterials, their characterization and determination. Within the metallic NPs, gold nanoparticles (AuNPs) have a great potential, since they can easily adapt to desirable sizes. In addition, they are easy to elaborate and can be functionalized without changing the biological activity of the resulting species.² They show unique optical properties, due to the oscillation of surface plasmons (SP), which occur at frequencies located in the visible region and result in a strong resonance absorption of SP (LSPR). This property allows the use of AuNPs in several applications such as Raman sensors,³ photoelectrochemical materials,⁴ in diagnostic tests with biomedical imaging⁵ or catalysts.⁶ AuNPs are also

used for many biological applications as nucleic acid hybridization, delivery of genes to cells,⁷ and others.

The increasing use of engineered NPs in industrial and domestic applications means that these materials are released into the environment and can accumulate in biological systems.⁸ However, little is known about the influence and fate of NPs, in part because there are still not many analytical methods for their quantification in complex matrices, such as environmental, food or biological matrices. The development of regulatory frameworks and an adequate risk assessment is increasingly necessary to guarantee the safety of the NPs and reduce their impact. For this, it is necessary to develop analytical methods that are easy to apply and are duly validated.⁹ To date, the methods used for the detection, characterization and quantification of engineering NPs, especially in complex matrices, are, in most cases, laborious, expensive and require specialized operators.¹⁰

Several techniques have been used to characterize and detect AuNPs, although promising advances have been made, all of which present several limitations;¹¹⁻¹³ microscopic, spectroscopic, or hyphenated techniques, among others. In many cases, these techniques require laborious procedures of sample preparation, especially biological samples. Therefore, reliable analytical methods that can address these challenges are urgently needed. Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) is a powerful vibrational technique^{14, 15} of increasing importance in Nanoscience field. Thus, many researchers use AuNPs as SERS substrates to determine several analytes in different types of samples.¹⁶⁻¹⁹ Molecules with a good ability to adsorb on metallic surfaces, even in presence of potentially interfering matrix components, could be good candidates as Raman reporters to propose a SERS method. In this article, a set of sensor molecules such as synthetic food dyes have been checked as potential Raman reporters, being selected erythrosine for showing a strong affinity to the surface of AuNPs. The increase of the signal depends on the innate properties of the compounds that interact with the AuNPs. So far, SERS analytical methods have not been tested to quantify AuNPs in complex samples. With this aim, SERS signal of erythrosine, a conjugated aromatic molecule especially suited to undergo a charge-transfer mechanism contributing to signal magnification, has been used in a double

way, on one side to directly analyze erythrosine and on the other side to indirectly determine AuNPs. Therefore, a novel SERS system that can be work as double sensor was developed and applied to quantify erythrosine in food samples and AuNPs in environmental, biological and cosmetic samples. In addition, the proposed procedure has been thoroughly validated considering the principles of analytical nanometrology.¹ The results obtained have been very satisfactory despite the difficulty of preserving the integrity of NPs in these matrices.

IV.1.2. Materials and methods

IV.1.2.1. Chemicals, materials and reagents

All aqueous solutions were prepared using 18.2 M Ω cm water purified with a Milli-Q Plus system (Millipore, Bedford, MA, USA) and analytical grade reagents. Analytical grade standards of gold (III) chloride ($\geq 99.9\%$), sodium citrate ($\geq 99\%$), gold colloids of 40 and 60 nm diameter stabilized suspensions in citrate buffer, carmoisine (50%), amaranth (85 – 95%), ponceau 4R (75%), erythrosine B ($\geq 95\%$) and red 2G (60%) were acquired from Sigma Aldrich (Madrid, Spain). Stock standard solutions of 10 mg mL⁻¹ of each one of the synthetic dyes were prepared in water and stored in absence of light. Other interference species such as glucose, fructose, sodium chloride, sodium nitrate, sodium sulphate anhydrous, sodium carbonate anhydrous were also purchased from Sigma Aldrich (Madrid, Spain).

Hydrochloric acid (37% w/v), ethanol (96% v/v) and acetone were purchased from PanReac (Barcelona, Spain). Nitric acid (69%) was obtained from Labkem (Barcelona, Spain). Ethyl acetate was acquired from Fisher Chemical (Loughborough, UK).

IV.1.2.2. Instrumentation

UV-Vis spectra of each particle size were collected on a SECOMAN UVI Light XS 2 spectrophotometer between 300 and 800 nm, equipped with a LabPower V3-50 for absorbance data acquisition. High-resolution scanning electron microscopy (HR-SEM) analyses were carried out by a ZEISS GeminiSEM 500 equipment with an energy dispersive spectroscopy (EDS) sensor of 80 mm² and another one of

electron backscatter diffraction (EBDS) (Oxford). Dynamic light scattering (DLS) and Z potential measures were done in a ZETASIZER nanoseries ZEN 3500 (Malvern). Raman spectra were recorded using a portable Raman spectrometer system provided by B&W TEK i-Raman BWS415, using an excitation wavelength of 785 nm. The maximum laser output power is 348 mW at the system excitation port and, after exciting the probe, the laser power is 285 mW. For measurements, the optimal laser output power used in the probe was 28.5 mW, which corresponds to 10% of the total offered by the laser, to avoid damaging the samples. Laser beam was focused during all measurements to the sample through a 40 x /0.65 oil. Raman signals were acquired by a charge-coupled device cooled to 10 °C. The spectrometer data acquisition software program used was BWSpec with a spectrometer interface: USB2.0. Before performing each sample measure, a background scan with the optimal parameters was collected to remove dark noise. The measurement time was set to 10 s per scan, and each spectrum turned out to be the average of 3 scans so total integration time was 30 s. A Theratherm DE LUXE PAR38 Red IR lamp (Osram) with 150 W and 230 V, a microcentrifuge BioSan Microspin 12 (LabNet Biotecnica S. L.), a vortex stirrer V05 series (LBX instruments), with speed control and an ultrasound bath (Selecta) were also used.

Computational study of erythrosine B molecule was carried out using the GAUSSIAN 16 series of programs. In order to include electron correlation at a reasonable computational cost, density functional theory (DFT) was used. The structure was fully optimized by means of the B3LYP method with the standard 6-31G+(d,p) basis set.

IV.1.2.3. Synthesis of AuNPs with different sizes

All the glass material used was previously washed in a bath of freshly prepared aqua regia (HCl:HNO₃, 3:1 v/v), subsequently rinsed with pure water and air-drying before being used. AuNPs coated with citrate were synthesized using a previous nucleation and growth technique²⁰ based on Turkevich-Frens method. This technique consists of synthesizing small AuNPs (seeds) and adding different amounts of gold to increase their size until the desired one was achieved. Five different particle sizes

were obtained between 18.3 to 70.8 nm. For that, 50 mL of sodium citrate 2.2 mM were heated under reflux, once the boiling point was reached an aliquot of 333 μ L of HAuCl₄ 25 mM was added to the solution under vigorous stirring and allowed to react for 30 min out of light. The color of the solution changed to deep red indicating the formation of AuNPs seeds. The NPs obtained in this first step were called c_0 . Once this stage was finished, the process temperature was decreased to 90 °C and 333 μ L of HAuCl₄ 25 mM were again added to the round bottom flask to continue the reaction for another 30 min. The product obtained now was called c_0+1Au . The procedure was repeated once again with another 333 μ L of HAuCl₄ 25 mM addition, giving the reaction 30 min more. The product obtained was called c_0+2Au , for the two gold additions that were added after the nucleation process. Once this stage was reached, a portion of the obtained AuNPs was extracted, leaving approximately 18.3 mL of the product in the flask. The extracted product was set aside to cool to room temperature and stored at 4 °C in an opaque vial to avoid alterations due to light.

Once the product was extracted, approximately 17.6 mL of deionized water and an aliquot of 666 μ L sodium citrate 60 mM was added to the flask and the mixture was kept stirred for 15 min for its complete homogenization. This stage of dilution of the product by addition of water and citrate was called *diluted* c_0+2Au . The addition processes of HAuCl₄ solution 25 mM were repeated in the same way to achieve the products c_1 , c_1+1Au and c_1+2Au . The process was repeated cyclically until growth c_4+2Au was obtained.

IV.1.2.4. AuNPs characterization studies

IV.1.2.4.1. UV-Vis characterization

Absorbance measurements of 1:10 dilutions of the five different AuNPs synthesized were performed to determine their SP band which is related to particle size.²¹ The particle diameter (d) of each growth was estimated basing on the half-empirical equation 1, employing the wavelength where the absorbance is maximum in each spectrum (λ_{SPR}):

$$d = \ln((\lambda_{SPR} - \lambda_0)/L_1)/L_2 \quad \text{Eq (1)}$$

given by Haiss and coworkers²¹ and using the parameters of $\lambda_0 = 512$ nm; $L_1 = 6.53$; $L_2 = 0.0216$.

IV.1.2.4.2. SEM and EDS characterization

Size and shape of the synthesized AuNPs were also checked by SEM technique according to the following procedure: 50 μ L of each AuNPs fraction were deposited over a multi-walled carbon nanotubes platform and dried under IR lamp. Several platforms were initially used but only the one mentioned was the one that allowed us to obtain clear images. EDS analyses were recorded using the same samples to have an idea of their composition.

IV.1.2.4.3. Calculation of the concentration of the synthesized AuNPs

Previous studies have shown a relationship between the NPs size and its concentration.²² Molar concentrations (C) of all AuNPs solutions obtained were determined according to equation 2 considering that all gold (III) is reduced to elemental gold atoms:

$$C = N_{total} / N \cdot V; \quad N = 30.9 \cdot (\text{experimental NP diameter, nm})^3 \quad \text{Eq (2)}$$

where, N_{total} is equivalent to the initial amount of gold precursor added to the reaction, N is the average number of gold atoms for each size of nanosphere and, finally, V is the total reaction volume (L). To calculate the concentrations in units of particles per volume it is necessary to use the Avogadro's constant.

The average particle sizes obtained by SEM technique have been used for calculating the concentrations.

IV.1.2.4.4. DLS and Z potential characterization

Hydrodynamic sizes were obtained from DLS measurements by 1:5 dilutions of the different AuNPs solutions. The results are given as the average value of 3 measurements. For determining Z potential values, 1:5 diluted AuNPs solutions of each synthesized fraction were prepared and measured using an electrophoretic light scattering (ELS) detector.

IV.1.2.5. Samples treatment

To simulate AuNPs contaminated environmental water, drinking water was collected directly from a tap in the laboratory and was filtered through a 0.45 μm nylon filter, spiked with different concentrations of AuNPs with an average particle size of 70.8 nm and homogenized by stirring in vortex. 1 mL of tap water containing spiked AuNPs was centrifuged at 4500 rpm for 5 min. Finally, the supernatant was removed, and then the extract was washed with deionized water repeating the previous process until obtaining the AuNPs suspended in a volume of 30 μL , carefully measure with a syringe. One drop of 10 μL of this extract was deposited on the CaF_2 -Erythrosine B hybrid substrate to perform SERS measurements.

Fresh mussels acquired from a local market were washed many times with ultrapure water. A lyophilization process has been simulated washing several times 3 g of selected tissue with acetone to remove the water that remained inside them. When the mussels tissue was well dried, it was crushed to obtain a powder. This powder was sieved to get a homogenous particle size. 0.01 g of this mussels powder was spiked with different concentrations of AuNPs and suspended in 1 mL of ultrapure water. The mixture was homogenised with vortex agitation. After that, this mixture was allowed to decant for 10 min and the supernatant was centrifuged for 5 min at 4500 rpm. Finally, the obtained supernatant was eliminated, and the extract was washed with deionized water. The process was repeated and finally the AuNPs were suspended in 30 μL of deionized water. One drop of 10 μL of the gold extract was deposited on the CaF_2 -Erythrosine B hybrid substrate for SERS measurements.

Facial tonic purchased from a local cosmetics store was spiked with different concentrations of AuNPs and homogenized by vortexed. 1 mL of facial tonic with spiked AuNPs was transferred to an eppendorf and washed three times with ethyl acetate in order to eliminate organic impurities that may interfere in the measures. The aqueous phase was centrifuged at 4500 rpm for 5 min, the supernatant was removed, and the extract was washed with deionized water finally obtaining the concentrated extract of AuNPs in 30 μL . Raman measurements were achieved as in previous samples.

As previously mentioned, the AuNPs were contained in 1 mL of sample that was pre-concentrated from 1 mL to 30 μ L after their treatment, so, a pre-concentration factor of 33.3 times was considered.

Cocktail cherries endogenously containing erythrosine B were bought from a local market and crushed with a knife mill. In order to take the dye from them, a solid-liquid extraction was carried out. 10 mL of a mixture of ethanol:water: (50:50, v/v) as extractant were added to 1 g of the crushed sample. After 2 min of stirring by vortex and 5 min of ultrasounds, the mixture was filtered using a funnel fitted with a pleated filter. The remaining solid sample was treated with an additional 1 mL of extractant mixture, and the same process was repeated. Two drops of this extract were deposited on the CaF₂-AuNPs substrate for SERS measurements.

IV.1.2.6. SERS measurements

For SERS measurements, the following procedure was carried out: each drop, which contained 10 μ L of solution, was deposited on a CaF₂ plate previously cleaned with an aqua regia mixture and located under an IR lamp to dry the drops.

To evaluate AuNPs in the samples mentioned above, a hybrid substrate CaF₂-Erythrosine B was prepared as follows: two drops of 0.9 mg L⁻¹ (1 μ M) of erythrosine B solution, that is, a total of 20 μ L of dye, were deposited dropwise on a CaF₂ plate. Between the additions of drops, these were dried and the next one was not added until the previous one was completely evaporated. Once the CaF₂-erythrosine B hybrid substrate was prepared, one drop of different concentrations of synthesized AuNPs or samples containing AuNPs was added. The addition of each drop of NPs was always added right above of the substrate previously prepared and the IR lamp was continuously heating in order to evaporate the drops. For SERS measurements of the dye signals due to the presence of AuNPs, a portable Raman spectrometer with a 785 nm diode laser was used and 30 s of acquisition time were employed for each of the measurements. For each analyte concentration, three different substrates were prepared. The measurement of each of them was obtained from eleven different randomly zones, therefore, a total of 33 SERS measurements

were recorded. The Raman band of erythrosine B at around 1164.1 cm^{-1} was selected as analytical signal and used to quantify AuNPs in samples.

For determining erythrosine B, a little variation on the deposition order of the drops with respect to the previous case was employed, preparing a hybrid substrate CaF₂-AuNPs as follows: one drop of 23.2 ng L^{-1} AuNPs solution was deposited over a CaF₂ plate and was dried under an IR lamp. Once this substrate was prepared, two drops erythrosine standard or sample solution were deposited dropwise. The same analytical signal above was studied.

The scheme of the analytical process for determining erythrosine B and AuNPs by SERS measurements is illustrated in **Figure IV.1.1**.

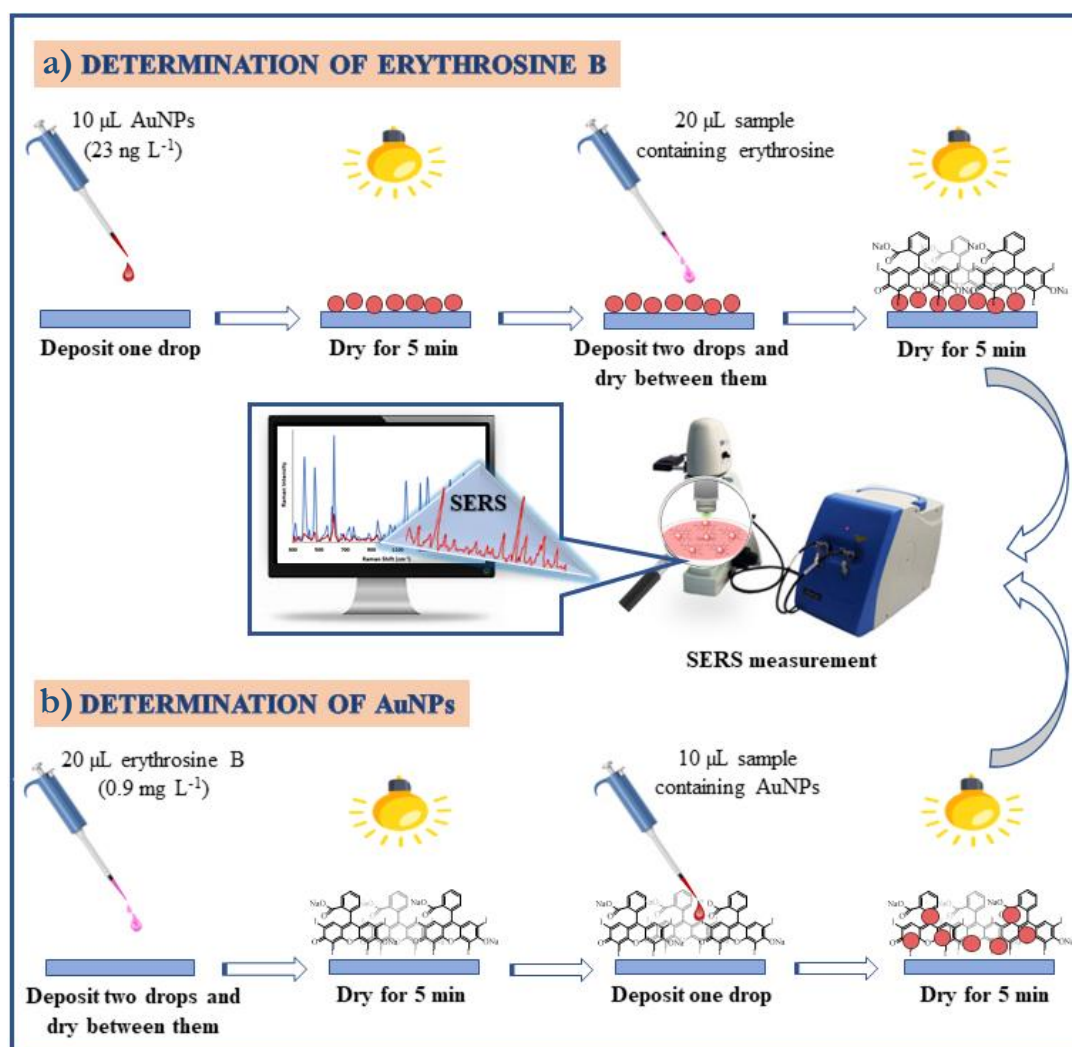


Figure IV.1.1. Schematic diagram illustrating the analytical process for determining (a) erythrosine B and (b) AuNPs by SERS measurements.

It could be said that the enhancement factor (EF) is one of the most important parameters for characterizing the SERS effect. All EF were calculated using equation 3:²³

$$EF = (I_{SERS}/I_{Raman}) \cdot (N_{Raman}/N_{SERS}) \quad \text{Eq (3)}$$

where, the intensity I_{SERS} is the height of the dye enhanced signal due to the presence of AuNPs and intensity I_{Raman} is the height found in the absence of the metal surface; both at the same Raman shift, and N represents the total number of the dye molecules deposited onto the substrate.

IV.1.3. Results and discussion

IV.1.3.1. Characterization of AuNPs

The physical characteristics of AuNPs are strongly influence by their LSPR band. So, an exigent and rigorous characterization of the different particle growths is necessary to choose one of them as the most suitable component for the SERS system.

AuNPs used in this work were synthesized and exhaustively characterized by different techniques such as UV-Vis spectroscopy, SEM and DLS. **Figure IV.1.2** shows the UV-Vis spectrum for each synthesized particle growth. The appearance of a SP band at 521 – 543 nm and their reddish solution color confirms the existence of them. As the particle size increases, its color exhibits a smooth transition from deep red to dark pink.

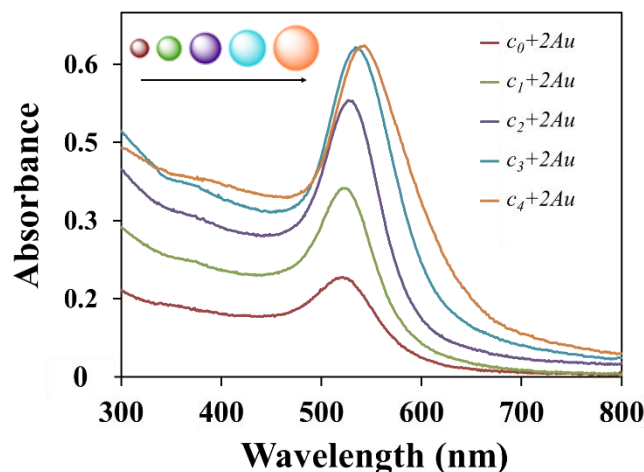


Figure IV.1.2. UV-Vis spectra of synthesized AuNPs with different particle sizes in aqueous solution.

The sizes of the synthesized AuNPs were estimated following the equation 1 (described in section “*UV-Vis characterization*”) and are summarized in **Table IV.1.1**. It was observed how the wavelength of the SP bands depends on the particle size, as shown by the bathochromic shift of the SP wavelength value (λ_{SPR}) with the increase in size. Furthermore, in UV-Vis spectra it can be appreciated that the red shift is accompanied by a small broadening of the SP band in the long-wavelength region.

In addition, synthesized AuNPs were characterized by SEM, which allowed us to know the nominal sizes of the colloids formed and by EDS to know the composition of the sample. The values obtained, also included in **Table IV.1.1**, are very similar to those obtained by UV-Vis. The sizes of the NPs were approximately comprised between 15 to 75 nm and, further, high monodispersed of the particle diameter was obtained. While the overall shape of these NPs appeared spherical, faceted edges along the outlines of many particles can be observed upon close examination with this technique, which is consistent with the polycrystalline properties of AuNPs.²⁴ **Figure IV.1.3** shows a SEM image of an intermediate growth of synthesized AuNPs.

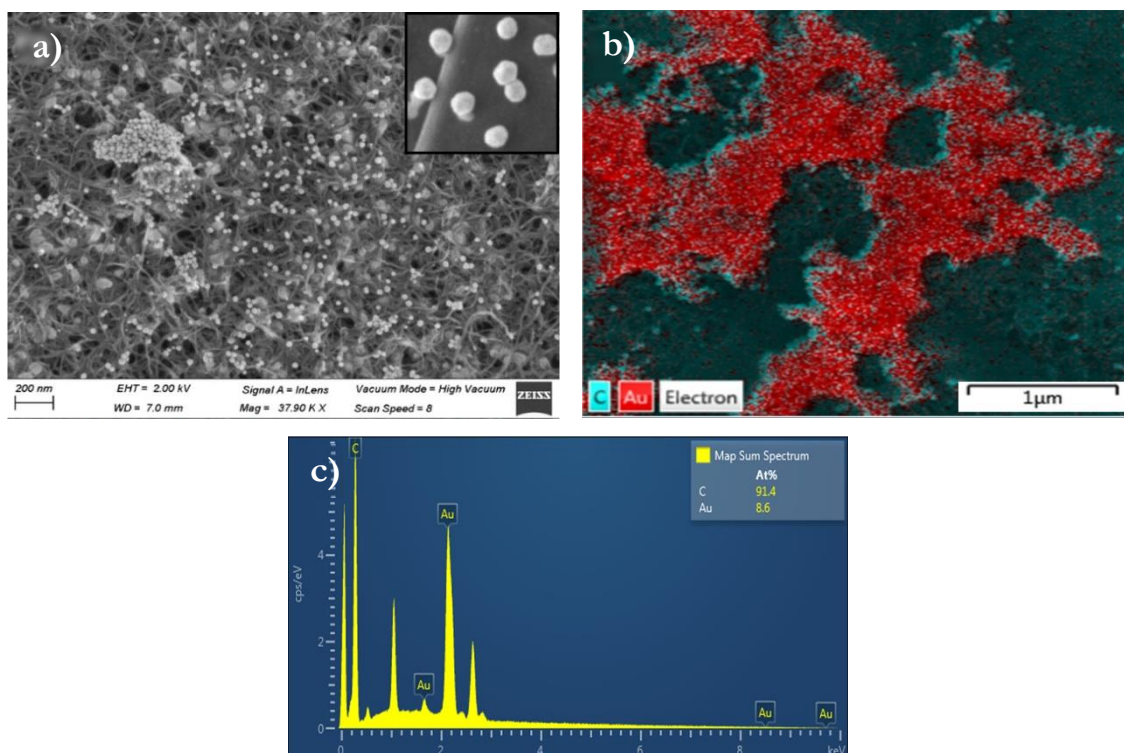


Figure IV.1.3. (a) SEM image, (b) elemental mapping and (c) EDS spectrum of synthesized AuNPs with an average size of 43.2 nm deposited on a carbon-based platform.

Through DLS studies the hydrodynamic NPs size was measured and the found results are also shown in **Table IV.1.1**, which turned out to be slightly higher than those obtained by the previous techniques as expected. On the other hand, to evaluate the colloidal stability of these NPs, Z potential was measured. Values lower than -30 mV were obtained, which indicates that the NPs present high colloidal stability and are surrounded by a negative charge.²⁵

The concentrations of each particle growth solution were determined according to equation 2 (described in section “*Calculation of the concentration of the synthesized AuNPs*”). The range of concentrations from the different growths solutions was between $1.18 \cdot 10^{-10}$ and $2.59 \cdot 10^{-9}$ M.

All the characterization results obtained from the synthesized NPs are summarized in **Table IV.1.1**.

Table IV.1.1. Physicochemical characteristics of the different AuNPs growths.

Growth step	λ_{SPR} (nm)	UV-Vis size (nm)	SEM size (nm)	DLS size (nm)	Z potential (mV)	Concentration	
						(M)	(NPs mL ⁻¹)
c_0+2Au	521	14.8	18.3 ± 2.3	20.3 ± 1.3	-32.4 ± 2.1	2.59·10 ⁻⁹	1.56·10 ¹²
c_1+2Au	523	24.1	26.4 ± 3.9	27.7 ± 2.5	-33.6 ± 3.1	1.62·10 ⁻⁹	9.76·10 ¹¹
c_2+2Au	529	44.3	43.2 ± 4.2	44.7 ± 6.2	-36.0 ± 6.7	4.55·10 ⁻¹⁰	2.74·10 ¹¹
c_3+2Au	536	60.2	60.1 ± 3.7	60.9 ± 5.6	-35.4 ± 2.3	1.85·10 ⁻¹⁰	1.11·10 ¹¹
c_4+2Au	543	72.1	70.8 ± 4.1	71.9 ± 6.2	-33.7 ± 2.6	1.18·10 ⁻¹⁰	7.08·10 ¹⁰

IV.1.3.2. Appraisal of SERS intensity of food dyes using AuNPs

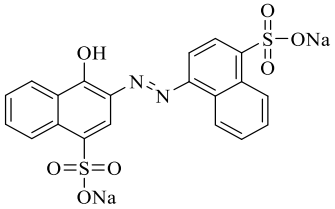
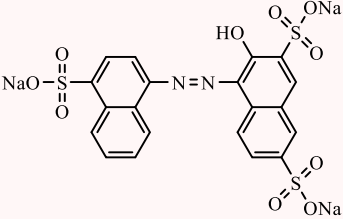
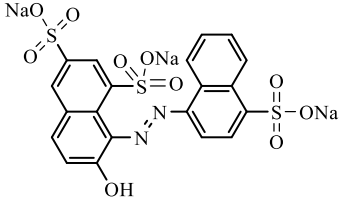
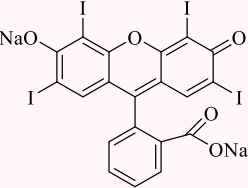
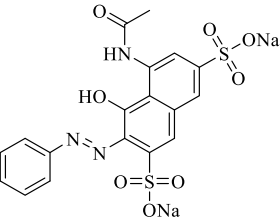
Up to now, many papers have been addressed towards the use of SERS technique to determine a lot of analytes using nanoscale noble metals as analytical tool. However, main the objective of this work is to apply SERS in the opposite way; this means, to find compounds that can be linked to AuNPs and produce a considerable enhancement of its Raman signal due to the present of NPs as analyte. A set of compounds belonging to the family of food dyes, which present in their chemical structure a system of conjugated double bonds, were selected as good candidates for NPs sensors by SERS measurements.

In order to check the SERS intensity that produce the AuNPs over several food dyes and choose the best, preliminary studies without optimizing any parameter but all of them with the same experimental conditions were carried out. For that, mixtures with 0.5 mM of each dye solution and gold colloid with 43.2 nm of particle size were prepared. One drop of these mixtures was placed on a CaF₂ Raman plate and, after drying, the corresponding Raman spectra were recorded. These spectra were compared with the obtained when placing one drop of 1 mM of the dye solution alone.

Table IV.1.2 shows chemical structures and EF obtained for each dye checked dye using the most sensitive signal for each of them. As it can be observed, erythrosine B as Raman reporter revealed the highest AuNPs-binding affinity and, therefore, the

maximal SERS response. This fact can be explained attending to SERS mechanisms that can take place between dye molecules and metal surface as explained in section “Overview about SERS mechanisms affecting erythrosine molecules”.

Table IV.1.2. Chemical structures of the selected food dyes and their corresponding EF.

Dye	Chemical structures	EF
Carmoisine (E-122)		19
Amaranth (E-123)		42
Ponceau 4R (E-124)		39
Erythrosine B (E-127)		64
Red 2G (E-128)		16

The sensitive band at 1164.1 cm^{-1} , assigned to the asymmetrical tension in the vibration $\nu(\text{C-O-C})^{26}$ of erythrosine B, was selected as analytical signal for EF calculations attending to its linear behavior regarding the analyte concentrations. Therefore, erythrosine B can be a sensitive Raman reporter of AuNPs and in turn

AuNPs can be used as analytical nanotool to determine erythrosine in several matrices of interest.

IV.1.3.3. Optimization of the procedure for SERS measurements

To obtain the best results in SERS, several variables were optimized for the preparation of the hybrid SERS substrate. The first thing was to select the substrate in which the sample was to be deposited. Several substrates were tested and CaF_2 was selected as the best option for sample deposition. The use of this substrate provided a more sensitive detection of the sample and has also shown its own strong Raman band at 319.6 cm^{-1} , which does not interfere with erythrosine B signals.

Two different procedures for the detection of the magnified erythrosine Raman signal due to the presence of AuNPs were tested. The first procedure carried out involved the two-step drop-wise deposition, first erythrosine B solution on the CaF_2 plate and when it was dry, next, AuNPs were deposited on top. The second option, erythrosine and AuNPs were previously mixed before the joint deposition of both in CaF_2 plate. The first approach led to a high-density distribution and homogeneous amounts of “hot spots” in the substrate, so, Raman bands more intensified were observed. Also, all particle sizes synthesized were studied at the same concentration ($7.08 \cdot 10^{10}$ particles mL^{-1}) observing that the increase in particle size leads to better SERS. Therefore, the highest particle size synthesized, average size of 70.8 nm, was used for all measurements.

The next step was to optimize the concentration and volume of erythrosine solution deposited over the plate. For it, different solutions of the dye with concentrations between 0.1 μM and 1 mM were prepared. One drop of each concentration was deposited on the plate and once dry the AuNPs were deposited. Each concentration was prepared by triplicate for performing measurements. It turned out that the Raman signal intensity increases until 10 μM , high concentrations of erythrosine lead to spectra with poorly defined bands probably because of the high fluorescence of the sample and also a decrease in the signal intensity maybe due to the excess of dye that can be adsorbed at nanostructured metal. Lower erythrosine concentrations also decrease the signals. In **Figure IV.1.4a**, it can be observed that

the SERS intensities at 1 and 10 μM concentrations were very similar, for that reason 1 μM of erythrosine B solution was selected as the best option for the following experiments. Also, different volumes of the dye solution 1 μM between 10 and 50 μL were tested with several depositions. Each deposition consisted of 10 μL volume that was evaporated before depositing the next drop. As can be seen in **Figure IV.1.4b**, the Raman signal was dramatically increased until 20 μL of erythrosine solution, however, further depositions worsened the signal. Thus, two depositions of dye were selected as optimum volume for preparation the CaF_2 -erythrosine B hybrid substrate. This essay was also prepared by triplicate and each replicate was the result of 10 independent measurements.

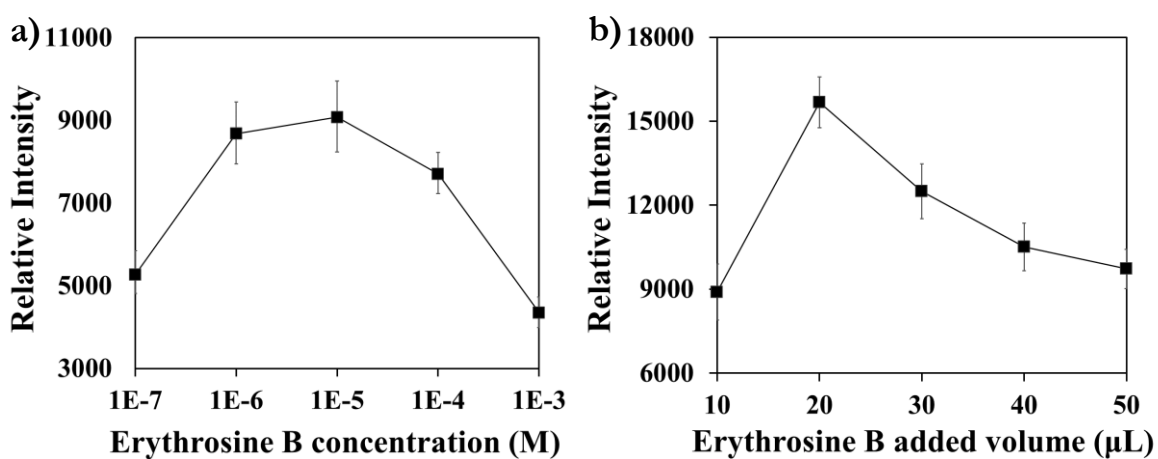


Figure IV.1.4. SERS relative intensity at (a) different concentrations of erythrosine B and (b) increasing volumes of 1 μM erythrosine B solution for 1164.1 cm^{-1} peak.

IR lamp and hot plate way to dry the successive drops deposited on the CaF_2 plate was also essayed. The first one was selected although the drying time was longer, the concentration throughout the whole drop was much more homogeneous than using the hot plate, in which, the drop concentration was spread to the edges of it. Therefore, better reproducibility in the measurements was obtained using IR lamp. Moreover, it was checked that sonicated AuNPs solution before analysis showed less increase of the signal than AuNPs in absence of sonication, so, slightly aggregated NPs are better for SERS because of the more generation of “hot spots”. Finally, the instrumental variables were optimized. A laser wavelength of 785 nm and a laser output power of 10% on the probe were used in all measurements in order to avoid damaging the sample. The spectra were recorded with an acquisition time from 1 to

15 s per scan, 10 s was selected as the optimum acquisition time for measurement, performing an average of 3 scans for each one of them.

The relative SERS signal of the optimized sensor resulted to be stable with differences of less than 5% for at least 8 days, even though the sensor has been prepared daily to carry out the measurements.

Figure IV.1.5 shows the Raman and SERS spectra of erythrosine B under optimal conditions, where it can be observed that the most significant difference is the signal improvement, getting an EF of $2.4 \cdot 10^5$ for the selected food dye band.

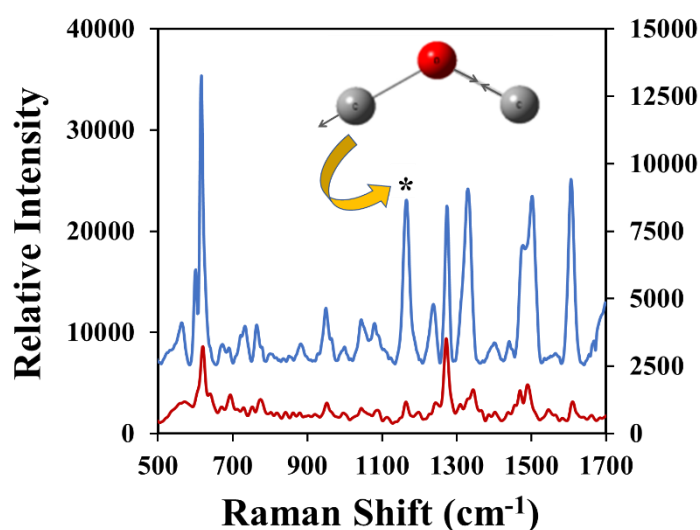


Figure IV.1.5. Raman spectrum of 10^{-2} M erythrosine B solution on a CaF_2 substrate (red line, right axis); SERS spectrum of 10^{-6} M erythrosine B solution in presence of AuNPs (blue line, left axis).

To achieve the best conditions for sensing erythrosine B, only the AuNPs concentration to prepare the CaF_2 -AuNPs hybrid substrate was optimized. Solutions of synthesized NPs with concentrations between 1 and 30 ng L^{-1} were prepared with particle size of 70.8 nm. After deposition of a drop of each of them on the plate and dry, 2 drops of erythrosine solution of 0.9 mg L^{-1} (1 μM) were also deposited. The maximal Raman enhancement was also obtained in presence of 23.2 ng L^{-1} of AuNPs, higher concentrations decrease the signal, so this concentration of NPs was selected as optimum in this determination. The other variables were the same that above.

IV.1.3.4. Overview about SERS mechanisms affecting erythrosine molecules

It is assumed there are two mechanisms governing the SERS phenomenon: a dominant physical mechanism of electromagnetic nature called electromagnetic (EM) mechanism and an additional chemical mechanism called charge-transfer (CT) mechanism. The EM mechanism is originated from LSPR exhibited here by the AuNPs, phenomenon by which the AuNPs become new sources radiation emitters, giving rise then to a great intensification of the EM field reaching dye molecules. This EM mechanism is influenced by factors related to AuNPs characteristics (nature, size, shape, morphology, among others) and by the distance and orientation between dye molecules (here used as analytes or reporters) and AuNPs. This intensification will be maximal in “hot spots” generated between AuNPs.²⁷ The CT mechanism is determined by physisorption (weak) or chemisorption (strong) interactions of molecules (adsorbate) on the metallic surface. The last phenomenon results in the formation of a chemical bond between adsorbate molecules and the metal, giving rise to a metal-adsorbate surface complex (M-A). Such molecules must present a center of interaction with the nanostructured surface, either through free electron pairs of a heteroatom, functional groups with an excess of negative charge or a π -conjugated system, among others.

In the present case, erythrosine B has revealed to be a good Raman reporter for its AuNPs-binding affinity, likely due to the CT mechanism, besides the EM one generated by AuNPs. The CT mechanism is here possibly accomplished by the interaction of the food dye with the metal surface through the non-binding electron pairs of iodine groups in erythrosine molecule,²⁸ by chemisorption on the metal surface. The HOMO (highest occupied molecular orbital) and the LUMO (lowest unoccupied molecular orbital) energy levels of erythrosine are -5.40 and -2.54 eV, respectively, while the Fermi energy level of Au is ca. -4.00 eV.²⁹

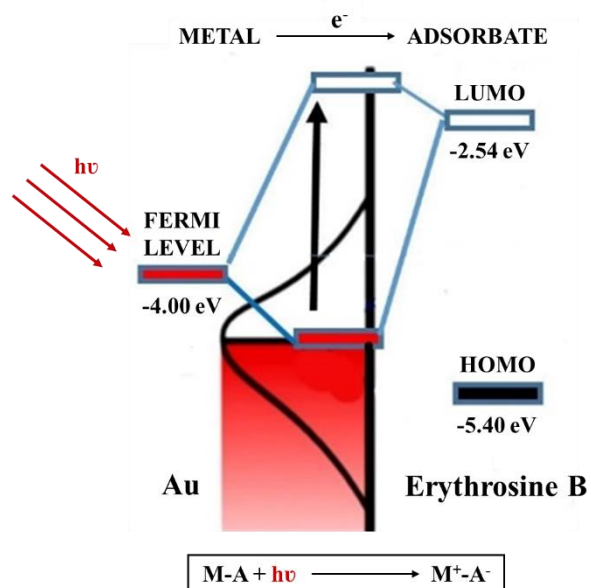


Figure IV.1.6. Illustration of CT process between Au nanomaterial and erythrosine molecule. Adaptation from reference [29]. Copyright © 2017, Elsevier.

As a result of the incident light, the energy of the photons is expected to produce the excitation of the electrons near the Fermi level of the metal, being transferred to the LUMO orbital of the erythrosine molecule, forming its corresponding anion (**Figure IV.1.6**). This fact would be due to the smaller gap energy existing between said orbitals than that one of a purely molecular transition (**Table IV.1.3**).²⁹

Table IV.1.3. Optimized erythrosine B structure and HOMO-LUMO distributions orbitals with their energies calculated by B3LYP/6-31G+(d,p) basis set.

Molecular structure	HOMO	LUMO	E_{GAP}
	-5.40 eV 	-2.54 eV 	2.86 eV

GAP: difference between the energies of the HOMO and LUMO orbitals.

This electronic transfer results in the formation of an electron-hole pair in the metal. Subsequently, the electrons are transferred back to the metal while the

adsorbate molecules remain vibrationally excited. The electrons that returned to the metal substrate recombined with holes, leading to enhanced Raman scattering. According to the literature²⁸ and contemplating the structure of the dye, a non-radiative CT process (CT-NR) can be assumed.

IV.1.3.5. Relationship between enhanced Raman signal and NPs size

Considering the experimental conditions previously selected, the effect of the particle size in the Raman signal was studied. AuNPs with different sizes were synthesized using the seed-mediated growth method.²⁰ **Table IV.1.1** shows the physicochemical characteristics of each used type AuNPs in the present study. Coming up next, a comparison of SERS spectra for all sizes was done. **Figure IV.1.7** plots the Raman relative intensity of erythrosine signal versus NP size maintaining a constant concentration of AuNPs ($7.08 \cdot 10^{10}$ particles mL^{-1}). As can be seen, there is a clear dependence on the SERS signal, and therefore the EF, with the particle sizes. A polynomial fit is adapted to this relationship as follows:

$$I_{SERS} = 8.03 (\text{size}_{\text{AuNPs}})^2 - 428.96 (\text{size}_{\text{AuNPs}}) + 5847.60 \quad R^2 = 0.9970$$

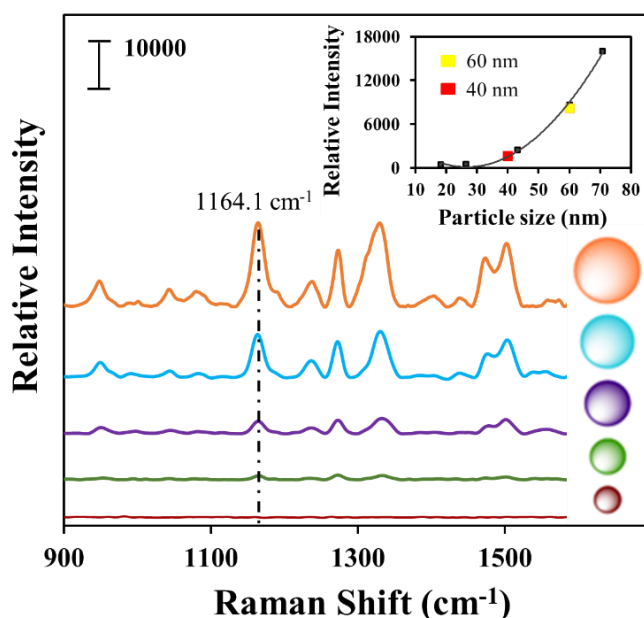


Figure IV.1.7. Increasing SERS intensity as a function of particle size of synthesized AuNPs. Inset: Relationship between Raman intensity at 1164.1 cm^{-1} and AuNPs size; 40 nm (red square) and 60 nm (yellow square).

Sizes equal or lower than 26.4 nm showed very low signal enhancement. These particle sizes would require higher aggregation to generate local “hot spots” to detect a considerable SERS effect. The acquired spectra using particles with sizes lower than 40 nm still showed noisy bands and not defined, however, using particles with sizes equal or higher than 40 nm, the SERS effect was clearly detectable. By continuing to increase the particle size, an even greater improvement in terms of the sensitivity of the Raman signal is achieved.

To check this approach that exponentially relates both variables, commercial analytical standards of 40 nm and 60 nm AuNPs suspensions, prepared at the same concentration as the synthesized particle sizes, were subjected to the Raman procedure proposed in this report. Particle sizes of 40.9 and 58.5 nm were estimated by Raman signal improvement of erythrosine, respectively. This empirical observation indicates that these simple experimental parameters can be used as a guide to quickly estimate the size of AuNPs, in this case coated citrate, par example in experimental designs of synthesis.

IV.1.3.6. Analytical features

The analytical performance of the proposed Raman method was studied in order to know its usefulness for quantitative determination of AuNPs and erythrosine B. The SERS intensity band at 1164.1 cm⁻¹ of erythrosine was selected as analytical signal but any other that directly increase its intensity with the concentration could also have been chosen. Analytical features were calculated by deposition of the optimal concentration and volume of AuNPs solutions on the CaF₂-erythrosine B hybrid substrate. The linearity was examined using AuNPs standard water solutions (average size of 70.8 nm) at increasing concentration from 1 to 30 ng L⁻¹. The following polynomial fit was obtained in this range of concentrations when plotting the Raman intensity of the band mentioned before versus AuNPs concentrations:

$$I_{SERS} = - 22.24 [\text{AuNPs}]^2 + 1201 [\text{AuNPs}] - 231.3 \quad R^2 = 0.9971$$

Each concentration level was analyzed by triplicate measuring in each sample at ten randomly selected locations within the substrate. Specifically, a lineal behavior of the system was found between 1 and 12 ng L⁻¹ according to the following equation:

$$I_{SERS} = (568 \pm 79) + (876 \pm 12) [\text{AuNPs}] \quad R^2 = 0.9991$$

Figure IV.1.8 shows this behavior and error bars depicts the standard deviation of the mean values.

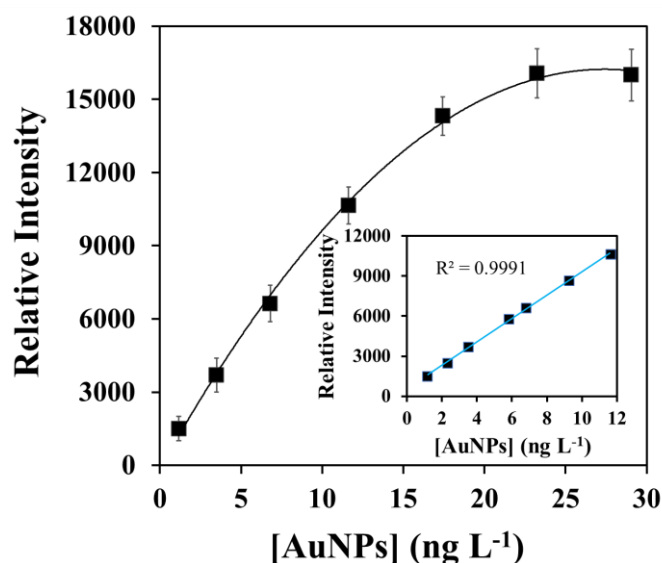


Figure IV.1.8. Influence of AuNPs concentration in the selected SERS intensity signal of erythrosine B. Inset: lineal fit for indirect determination of AuNPs under optimal conditions.

The detection and quantification limits (LOD and LOQ, respectively) were calculated as three or ten times the standard deviation of intercept between the slope of the obtained lineal regression. Values of 0.3 and 0.9 ng L⁻¹ were obtained, respectively. These results were later verified experimentally. To study the precision of the proposed method, eight independent measurements (resulting from an average of ten measures each of them) of analytical signal with 6.8 ng L⁻¹ of AuNPs solution were carried out. A relative standard deviation (RSD) value of 4.2% ($n = 8$) was obtained. This experience was repeated three different days in different plates for estimating the reproducibility obtaining 6.5% ($n = 24$) as RSD value. Analytical features of the proposed method for the determination AuNPs are summarized in **Table IV.1.4**. In addition, figures of merit for determining erythrosine B were calculated and are also summarized in **Table IV.1.4**.

Table IV.1.4. Figures of merit of the proposed method for determining of AuNPs or erythrosine.

Parameter	AuNPs	Erythrosine B
Lineal fit	$I = (568 \pm 79) + (876 \pm 12) \cdot [\text{NPs}]$	$I = (831 \pm 22) + (47 \pm 0.3) \cdot [\text{E}]$
Linearity range	1 – 12 ng L ⁻¹	5 – 150 µg L ⁻¹
R ²	0.9991	0.9997
LOD	0.3 ng L ⁻¹	1.4 µg L ⁻¹
LOQ	0.9 ng L ⁻¹	4.7 µg L ⁻¹
(%) RSD ^(a)	4.2	4.8
(%) RSD ^(b)	6.5	7.3

^(a) Relative standard deviation in terms of repeatability ($n = 8$) at 6.8 ng L⁻¹ or 48.4 µg L⁻¹ concentration of AuNPs or erythrosine, respectively within the same plate.

^(b) Relative standard deviation in terms of reproducibility ($n = 24$) at 6.8 ng L⁻¹ or 48.4 µg L⁻¹ concentration of AuNPs or erythrosine, respectively in three different days in different plates.

The selectivity of the proposed analytical method was evaluated in presence of possible interferences such as other NPs (AgNPs and TiO₂NPs), inorganic ions (Cl⁻, NO₃⁻, SO₄²⁻ and CO₃²⁻) and monosaccharides (glucose and fructose) (**Figure IV.1.9**). Each compound was added individually in an AuNPs test solution of 7 ng L⁻¹ at two concentration levels. The results obtained indicated that the inorganic ions and monosaccharides only provided marginal changes (< 5%) in the selected SERS signal even at high concentration levels. However, the presence of the essayed NPs produced a significant increase in the selected SERS signal. The enhancement produced could be attributable to the creation of more “hot spots” likely due to the fact of physical enrichment. Despite this, each type of nanoparticle has its own Raman signal and can be identified.

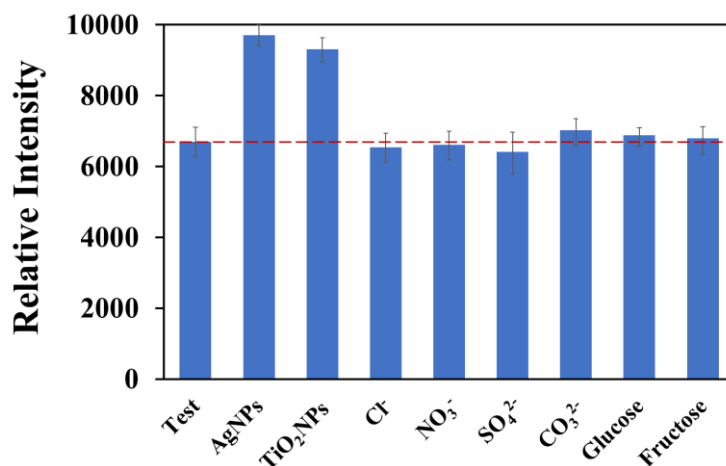


Figure IV.1.9. Effect of possible interference compounds on SERS signal intensity at 1164.1 cm^{-1} . $[\text{AgNPs}] = 32 \text{ ng L}^{-1}$, $[\text{TiO}_2\text{NPs}] = 28 \text{ ng L}^{-1}$, $[\text{Cl}^-] = 10 \text{ mg L}^{-1}$, $[\text{NO}_3^-] = 13 \text{ mg L}^{-1}$, $[\text{SO}_4^{2-}] = 12 \text{ mg L}^{-1}$ and $[\text{glucose}] = [\text{fructose}] = 15 \text{ mg L}^{-1}$.

A comparison between the proposed method with other methods described in the literature was performed. In the case of AuNPs determination (**Table IV.1.5**), the present analytical method resulted to be especially sensitive. In fact, few reported methods show a higher sensitivity, which can be compensated by the low cost, simplicity, speed and small sample volumes required in the proposed SERS methodology, just using an affordable and portable Raman instrument. Regarding the determination of erythrosine B (**Table IV.1.6**), it can be highlight that, to the best of our knowledge, this is the first analytical procedure that uses SERS to quantify this food dye, obtaining comparable results in terms of sensitivity with methods that use spectrophotometry UV-Vis as analytical technique.

Table IV.1.5. Comparative table with representative reported methods for the analysis of AuNPs.

Analytical method	Particle size	Linear range	LOD	Application	Reference
Electrochemical with differential pulse voltammetry technique	10 nm	0.154 – 154 ng L ⁻¹	0.059 ng L ⁻¹	-	[30]
Electrochemical with cyclic voltammetry technique	20 nm	0.94 – 295 ng L ⁻¹	0.20 ng L ⁻¹	Magnetoimmunoassays	[31]
Asymmetric flow field-flow fractionation coupled with light scattering detection and inductively coupled plasma-mass spectrometry	10 nm	8 – 80 ng	0.02 ng	Rat liver samples	[32]
	20 nm		0.20 ng		
	30 nm		0.30 ng		
	60 nm		0.40 ng		
Spectrophotometric	31 – 58 nm	Until 3.39 ng L ⁻¹	0.33 ng L ⁻¹	Chicken liver and river water samples	[33]
Electrothermal atomic absorption spectrometry	15 nm	12 – 240 ng L ⁻¹	5 ng L ⁻¹	Waste and river water samples	[34]
Laser ablation inductively coupled plasma mass-spectrometry	30 nm	3.6 – 360 fg	0.5 fg	Cell samples	[35]
Coupling thin layer chromatography with laser ablation inductively coupled plasma mass-spectrometry	13 nm	0.2 – 48 mg L ⁻¹	87 µg L ⁻¹	Water samples	[36]
	34 nm		79 µg L ⁻¹		
	47 nm		72 µg L ⁻¹		
Coupling of thin layer chromatography with chemiluminescence detection	13 nm	0.05 – 60 mg L ⁻¹	38.4 µg L ⁻¹	Water samples	[37]
	41 nm		35.9 µg L ⁻¹		
	100 nm		39.6 µg L ⁻¹		
High performance liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma-mass spectrometry	10 nm	Until 1 µg L ⁻¹	-	Rat tissues samples	[38]
High performance liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma-mass spectrometry	10 nm	-	0.62 µg L ⁻¹	Culture medium and cells for toxicity tests	[39]
	30 nm				
Surface-enhanced Raman spectroscopy	71 nm	1 – 12 ng L ⁻¹	0.3 ng L ⁻¹	Water, facial tonic and mussel tissue samples	This work

Table IV.1.6. Comparative table with representative reported methods for the analysis of erythrosine B.

Analytical method	Linear range	LOD	Application	Reference
Capillary electrophoresis with ultraviolet-visible detection Capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection	4.9 – 720 $\mu\text{g L}^{-1}$ 0.4 – 450 ng mL^{-1}	4.9 $\mu\text{g L}^{-1}$ 0.4 ng mL^{-1}	Cocktail cherry compote samples	[40]
Chemiluminescence flux injection	0.1 – 10.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0.03 $\mu\text{g mL}^{-1}$	Candy samples	[41]
Reversed-phase high performance liquid chromatography with diode array detection	1 – 50 mg L^{-1}	0.08 mg L^{-1}	Soft drink samples	[42]
Fluorometric	0.9 – 19.7 $\mu\text{g L}^{-1}$	0.5 $\mu\text{g L}^{-1}$	Saffron samples	[43]
Spectrophotometric	2.2 – 11.0 mg L^{-1}	0.17 mg L^{-1}		
Spectrophotometric	1.47 – 8.07 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0.50 $\mu\text{g mL}^{-1}$	Cosmetic and confectionery samples	[44]
High performance liquid chromatography with photodiode array detector	0.1 – 500 mg kg^{-1}	0.05 mg kg^{-1}	Meat samples	[45]
Electrochemical with differential pulse voltammetry	88 – 528 mg L^{-1}	0.17 mg L^{-1}	Urine samples	[46]
Scanometric by cloud point extraction	0.07 – 5.33 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0.058 $\mu\text{g mL}^{-1}$	Some food and cosmetic samples	[47]
Spectrophotometric by cloud point extraction	0.03 – 3.00 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0.021 $\mu\text{g mL}^{-1}$		
Fluorescence resonance energy transfer	0 – 7.04 mg L^{-1}	3.1 ng mL^{-1}	Cream biscuit and ice cream samples	[48]
Microspectrophotometric after ultrasonic assisted supramolecular-based dispersion solidification liquid-liquid microextraction	1 – 100 ng mL^{-1}	0.6 ng mL^{-1}	Water and beverage samples	[49]
Spectrophotometric by heat-induced homogeneous liquid-liquid microextraction	0.03 – 1.40 $\mu\text{g mL}^{-1}$	6 ng mL^{-1}	Drug, cosmetic and some food samples	[50]
Surface-enhanced Raman spectroscopy	5 – 150 $\mu\text{g L}^{-1}$	1.4 $\mu\text{g L}^{-1}$	Cocktail cherries samples	This work

IV.1.3.7. Analytical application

In order to validate the capability of the proposed analytical method to signify the presence and the quantification of AuNPs in samples of different matrix complexity as tap water, mussels tissue and facial tonic samples were selected. Thus, samples of tap water were spiked with AuNPs at four concentrations levels, 0.12, 0.23, 0.28 and 0.35 ng L⁻¹. These samples were treated as described in section “*Samples treatment*” and subsequently submitted to the analytical procedure described in section “*SERS measurements*”. **Figure IV.1.10a** corresponding to the tap water sample fortified with AuNPs shows the different bands of the erythrosine B substrate, demonstrating the signal enhancement effect due to the present of AuNPs. As expected, the characteristic peak of erythrosine increased as AuNPs concentration levels increased. The linear relationship between Raman intensity at 1164.1 cm⁻¹ and AuNPs concentration corroborates the potential of erythrosine-assisted SERS method proposed in this paper to quantify AuNPs in water samples.

Furthermore, it was evaluated the ability of erythrosine-assisted SERS approach to detect and quantify AuNPs in complex biological samples. Fresh mussels were treated as described above and AuNPs were detected using the same method as for tap water samples. As can be seen in **Figure IV.1.10b**, the characteristic peak of erythrosine at 1164.1 cm⁻¹ is enhanced by the presence of AuNPs in mussels tissue matrix. Therefore, this indicates that the approach was able to probe AuNPs in this type of matrix. Increasing concentrations of AuNPs produced a gradual improvement in the Raman intensity of erythrosine signal, which also confirmed the reliability of erythrosine as a good indicator for detecting AuNPs in this biological sample. In addition, a linear relationship was built between Raman intensity at 1164.1 cm⁻¹ and AuNPs concentration demonstrating the quantitative ability of the proposed method.

Finally, erythrosine-assisted SERS method was applied for detecting AuNPs in a type of cosmetic sample. Facial tonic samples were spiked with several concentrations of AuNPs and treated as previously described. As can be seen in **Figure IV.1.10c**, this SERS procedure was able to probe AuNPs in this cosmetic matrix. Satisfactory results were also obtained.

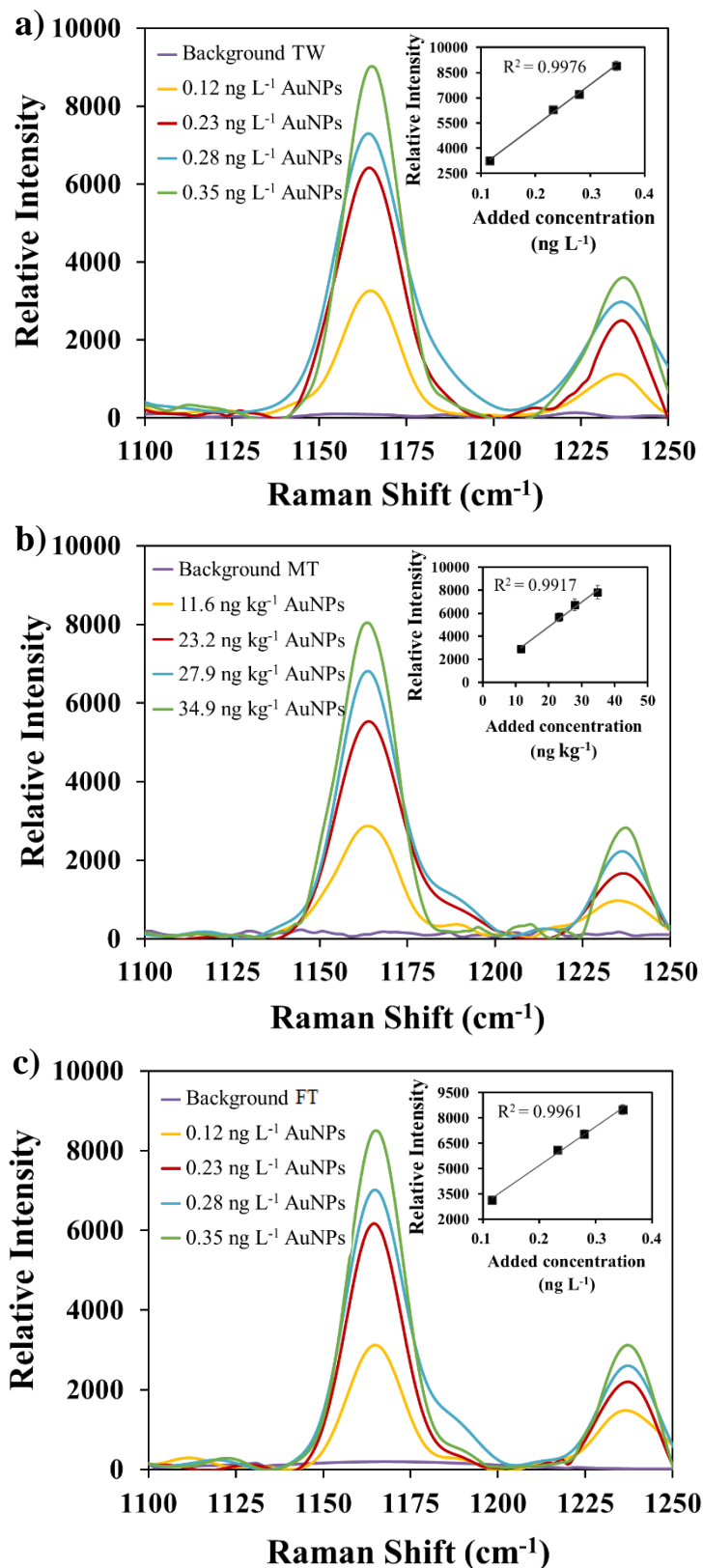


Figure IV.1.10. SERS spectra corresponding to different concentrations levels of AuNPs in (a) tap water (TW), (b) mussels tissue (MT) and (c) facial tonic (FT) using the erythrosine-assisted SERS method. Inset: Linear relationship between Raman intensity at 1164.1 cm⁻¹ and AuNPs added concentration.

Table IV.1.7 summarizes the intervals of recovery obtained for the three types of samples spiked with AuNPs, since each one is analyzed eleven times and the recovery percentages were calculated each time. Recovery and precision (RSD) values are depending on the complexity of the matrices. Thus, for water samples were in the range of ca. 90 – 99% (recovery) and 2 – 2.9% (RSD); for mussel samples of ca. 76 – 97% (recovery) and 5.1 – 6.3% (RSD); and for facial tonic of ca. 86 – 99% (recovery) and 3.1 – 3.4% (RSD). These values are particularly important considering the low concentration of AuNPs.

On the other hand, in order to evaluate the reliability of the proposed method for the determination of erythrosine B in food samples, cocktail cherries samples which endogenously contained this dye were analyzed. The samples were previously treated as described in section “*Samples treatment*”. The extracts of five crushed cherries samples were evaluated to know the content of erythrosine in this sample. For that, a calibration curve was prepared again with external standards in mixtures of ethanol:water (50:50, v/v). The proposed SERS method for the determination of erythrosine was compared with UV-Vis spectroscopy method for which a calibration curve with external standards was also prepared. The dye concentrations in this type of food sample obtained by SERS and UV-Vis methods resulted to be very similar between them with values of 59.8 ± 7.9 and 54.1 ± 5.5 mg kg⁻¹ ($n = 5$), respectively. To study the possible matrix effect, we also used standard addition method to analyse the cherries samples. For this purpose, several volumes of erythrosine B stock solution were added to samples and then extracted as previously described. The results obtained by standard addition procedure were consistent with those obtained above by external calibration and UV-Vis spectroscopy method. Recovery values in the range of 97 – 106% were obtained as can be seen in **Table IV.1.7**.

Table IV.1.7. Analytical monitoring of (a) AuNPs and (b) erythrosine B in different types of samples.

(a) Determination of AuNPs					
Type of sample	Sample	Spiked concentration	Found concentration ^(a)	Recovery interval (%)	RSD (%)
Tap water (ng L ⁻¹)	1	0.12	0.11 ± 0.01	90.1 – 97.3	2.48
	2	0.23	0.22 ± 0.01	91.7 – 98.2	2.38
	3	0.28	0.27 ± 0.01	90.8 – 98.6	2.02
	4	0.35	0.33 ± 0.02	90.3 – 98.6	2.90
Mussels (ng kg ⁻¹)	1	11.62	9.96 ± 0.83	78.3 – 92.7	6.14
	2	23.24	20.02 ± 1.25	80.3 – 92.2	5.15
	3	27.89	25.18 ± 1.65	80.2 – 97.2	6.27
	4	34.86	29.27 ± 1.95	76.0 – 91.3	6.10
Facial tonic (ng L ⁻¹)	1	0.12	0.11 ± 0.01	87.3 – 96.3	3.39
	2	0.23	0.22 ± 0.02	87.8 – 97.0	3.18
	3	0.28	0.26 ± 0.02	87.3 – 98.7	3.40
	4	0.35	0.32 ± 0.02	85.5 – 95.1	3.15
(b) Determination of erythrosine B					
Type of sample	Sample	Spiked concentration	Found Concentration	Recovery interval (%)	RSD (%)
Cocktail cherries (mg kg ⁻¹)	1	–	59.8 ± 7.9 ^(b) 58.6 ± 8.4 ^(c)	–	–
	2	10.6	10.5 ± 0.2	96.7 – 100.8	2.2
	3	16.7	17.3 ± 0.5	100.5 – 106.3	2.9
	4	25.5	26.7 ± 0.5	102.3 – 106.4	2.1

^(a) Average of 11 measurements of each sample ± confidence interval, $p < 0.05$.

^(b) Found concentration without standard addition method ($n = 5$) ± standard deviation.

^(c) Found concentration by standard addition method ($n = 3$) ± standard deviation.

IV.1.4. Conclusions

This work has shown that SERS detection offers interesting capabilities for sensing AuNPs in different types of samples in a quick and easy way. For the development of this methodology, several food dyes were tested as Raman reporters and erythrosine B was selected as the best one to sense AuNPs, as it is the substrate that provides the highest SERS signals when strongly adsorbed on the metal surface. This approach allowed us to develop of a double sensing strategy for both AuNPs and erythrosine B, which was shown to be effective in quantifying AuNPs and erythrosine in samples of interest. The proposed analytical method presents advantages such as its low cost, small sample volumes required, speed of analysis and just using an affordable and portable Raman spectrometer. These features are of significant interest for using this strategy in routine analysis. Furthermore, it is important to highlight the sensitivity of the methodology, especially for the determination of AuNPs. The high number of Raman signals presented by the SERS spectrum of erythrosine B allowed to select the one that does not interfere with the matrix components of the samples analyzed. An interesting challenge could be the applicability of the method to determine AuNPs of different nature in more complex matrices and to be able to minimize their influence, for which preconcentration and separation techniques should be investigated in the future.

Acknowledgments

The Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO) and the Regional Government of Castilla-La Mancha (JCCM) are gratefully acknowledged for funding this work with project CTQ2016-78793-P and grant SBPLY/17/180501/000262, respectively. Esther Pinilla-Peñalver also acknowledges MINECO for the predoctoral contract BES-2017-080357. We also want to thank C. Tardío for the computational studies.

References

1. López-Sanz, S.; Guzmán, F. J.; Rodríguez, R. C.; Ríos, A. Analytical metrology for nanomaterials: Present achievements and future challenges. *Analytica Chimica Acta* **2019**, *1059*, 1-15.
2. Dreaden, E. C.; Alkilany, A. M.; Huang, X.; Murphy, C. J.; El-Sayed, M. A. The golden age: gold nanoparticles for biomedicine. *Chemical Society Reviews* **2012**, *41*(7), 2740-2779.
3. López-Lorente, A. I.; Simonet, B. M.; Valcárcel, M.; Mizaikoff, B. Bare gold nanoparticles mediated surface Raman spectroscopic determination and quantification of carboxylated single-walled carbon nanotubes. *Analytica Chimica Acta* **2013**, *788*, 122-128.
4. Akiyama, T.; Inoue, K.; Kuwahara, Y.; Niidome, Y.; Terasaki, N.; Nitahara, S.; Yamada, S. Facile fabrication of morphology-controlled gold nanoparticle architectures by electrolyte-induced agglomeration and their photoelectrochemical applications. *Langmuir* **2005**, *21*(2), 793-796.
5. Aioub, M.; Austin, L. A.; El-Sayed, M. A. Gold nanoparticles for cancer diagnostics, spectroscopic imaging, drug delivery, and plasmonic photothermal therapy. In: *Inorganic Frameworks as Smart Nanomedicines*, William Andrew **2018**, pp 41-91.
6. Lerma-García, M. J.; Ávila, M.; Simó-Alfonso, E. F.; Ríos, A.; Zougagh, M. Synthesis of gold nanoparticles using phenolic acids and its application in catalysis. *Journal of Materials and Environmental Science* **2014**, *5*(6), 1919-1926.
7. Elahi, N.; Kamali, M.; Hadi-Baghersad, M. Recent biomedical applications of gold nanoparticles: A review. *Talanta* **2018**, *184*, 537-556.
8. López-Lorente, A. I.; Valcárcel, M. Determination of gold nanoparticles in biological, environmental and agrifood samples. In: *Comprehensive Analytical Chemistry*, Elsevier **2014**, pp 395-426.

9. OECD. Guidance on sample preparation and dosimetry for the safety testing of manufactured nanomaterials. In: *Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials* **2012**. <http://oecd.org/officialdocuments> (Accessed 5 July 2022).
10. Fabricius, A. L.; Duester, L.; Meermann, B.; Ternes, T. A. ICP-MS-based characterization of inorganic nanoparticles-sample preparation and off-line fractionation strategies. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2013**, *406*, 467-479.
11. Tiede, K.; Boxall, A. B. A.; Tear, S. P.; Lewis, J.; David, H.; Hassellöv, M. Detection and characterization of engineered nanoparticles in food and environment. *Food Additives and Contaminants: Part A* **2008**, *25*, 795-821.
12. Majedi, S. M.; Lee, H. K. Recent advances in the separation and quantification of metallic nanoparticles and ions in the environment. *Trends in Analytical Chemistry* **2016**, *75*, 183-196.
13. Levard, C.; Hotze, E. M.; Lowry, G. V.; Brown, G. E. Environmental transformations of silver nanoparticles: Impact on stability and toxicity. *Environmental Science and Technology* **2012**, *46*, 6900-6914.
14. Fan, M.; Andrade, G. F. S.; Brolo, A. G. A review of the fabrication of substrates for surface enhanced Raman spectroscopy and their applications in analytical chemistry. *Analytica Chimica Acta* **2011**, *693*, 7-25.
15. Kahraman, M.; Mullen, E. R.; Korkmaz, A.; Wachsmann-Hogiu, S. Fundamentals and applications of SERS-based bioanalytical sensing, *Nanophotonics* **2017**, *6*(5), 831-852.
16. Luo, T.; Wang, Y.; Li, J.; Peng, H.; Xiong, H.; Chen, L. Rapid detection of melamine with 4-mercaptopyridine-modified gold nanoparticles by surface-enhanced Raman scattering. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2011**, *40*, 333-338.
17. Villa, J. E. L.; dos Santos, D. P.; Poppi, R. J. Fabrication of gold nanoparticle-coated paper and its use as a sensitive substrate for quantitative SERS analysis. *Microchimica Acta* **2016**, *183*, 2745-2752.
18. Luo, H.; Wang, X.; Huang, Y.; Lai, K.; Rasco, B. A.; Fan, Y. Rapid and sensitive surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) method combined with gold

nanoparticles for determination of paraquat in apple juice. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2018**, *98*, 3892-3898.

19. Moreno, V.; Adnane, A.; Salghi, R.; Zougagh, M.; Ríos A. Nanostructured hybrid surface enhancement Raman scattering substrate for the rapid determination of sulfapyridine in milk samples. *Talanta* **2019**, *194*, 357-362.

20. Batús, N. G.; Comenge, J.; Puentes, V. Kinetically controlled seed growth synthesis of citrate-stabilized gold nanoparticles of up to 200 nm: Size focusing versus Ostwald ripening. *Langmuir* **2011**, *27*, 11098-11105.

21. Haiss, W.; Thanh, N. T. K.; Averyard, J.; Fernig, D. G. Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-Vis spectra. *Analytical Chemistry* **2008**, *79*, 4215-4221.

22. Liu, X.; Atwater, M.; Wang, J.; Huo, Q. Extinction coefficient of gold nanoparticles with different sizes and different capping ligands. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2007**, *58*, 3-7.

23. Yu, W. W.; White, I. M. A simple filter-based approach to surface enhanced Raman spectroscopy for trace chemical detection. *Analyst* **2012**, *137*, 1168-1173.

24. Cheng, H. W.; Skeete, Z. R.; Crew, E. R.; Shan, S.; Luo, J.; Zhong, C. J. Synthesis of gold nanoparticles. In: *Comprehensive Analytical Chemistry*, Elsevier **2014**, pp. 37-79.

25. Bhattacharjee, S. DLS and zeta potential-What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release* **2016**, *235*, 337-351.

26. Socrates, G. *Infrared and Raman characteristic group frequencies. Tables and charts*, John Wiley & Sons **2001**.

27. Halas, N. J.; Lal, S.; Chang, W. S.; Link, S.; Nordlander, P. Plasmons in strongly coupled metallic nanostructures. *Chemical Reviews* **2011**, *111*, 3913-3961.

28. Arenas, J. F.; Soto, J.; López, I.; Fernández, D. J.; Otero, J. C.; Marcos, J. I. The role of charge-transfer states of the metal-adsorbate complex in surface-enhanced Raman scattering. *Journal of Chemical Physics* **2002**, *116*(16), 7207-7216.

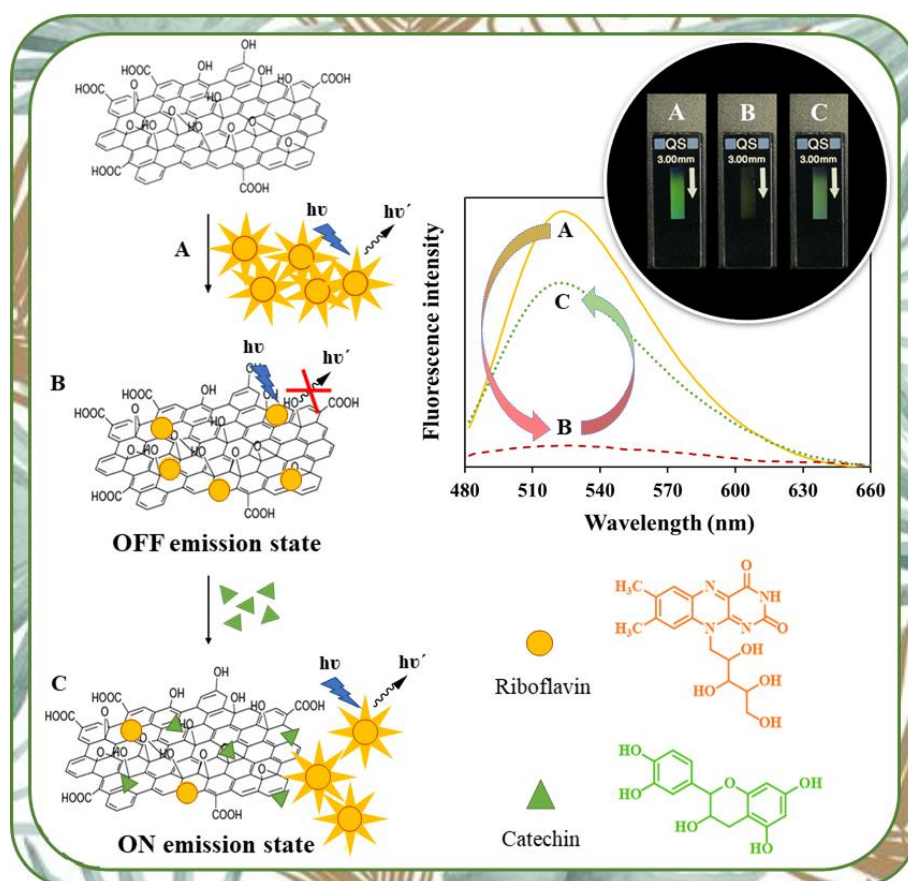
29. Grasseschi, D.; Toma, H. E. The SERS effect in coordination chemistry. *Coordination Chemistry Reviews* **2017**, 333, 108-131.
30. Pumera, M.; Aldavert, M.; Mills, C.; Merkoçi, A.; Alegret, S. Direct voltametric determination of gold nanoparticles using graphite-epoxy composite electrode, *Electrochimica Acta* **2005**, 50, 3702-3707.
31. Maltez-da Costa, M.; de la Escosura-Muñiz, A.; Merkoçi, A. Electrochemical quantification of gold nanoparticles based on their catalytic properties toward hydrogen formation: Application in magnetoimmunoassays. *Electrochemistry Communications* **2010**, 12, 1501-1504.
32. Schmidt, B.; Loeschner, K.; Hadrup, N.; Mortensenm A.; Sloth, J. J.; Khoch, C. B.; Larsen, E. H. Quantitative characterization of gold nanoparticles by field-flow fractionation coupled online with light scattering detection and inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **2011**, 83, 2461-2468.
33. López-Lorente, A. I.; Simonet, B. M.; Valcárcel, M. Rapid analysis of gold nanoparticles in liver and river water samples. *Analyst* **2012**, 137, 3528-3534.
34. Hartmann, G.; Schuster, M. Species selective preconcentration and quantification of gold nanoparticles using cloud point extraction and electrothermal atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **2013**, 761, 27-33.
35. Wang, M.; Zheng, L. N.; Wang, B.; Chen, H. Q.; Zhao, Y. L.; Chai, Z. F.; Reid, H. J.; Sharp, B. L.; Feng, W. Y. Quantitative analysis of gold nanoparticles in single cells by laser ablation inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **2014**, 86, 10252-10256.
36. Yan, N.; Zhu, Z.; Jin, L.; Guo, W.; Gan, Y.; Hu, S. Quantitative characterization of gold nanoparticles by coupling thin layer chromatography with laser ablation inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **2015**, 87, 6079-6087.
37. Yan, N.; Zhu, Z.; He, D.; Jin, L.; Zheng, H.; Hu, S. Simultaneous determination of size and quantification of gold nanoparticles by direct coupling thin layer chromatography with catalyzed luminol chemiluminescence. *Scientific Reports* **2016**, 6(1), 24577.

38. Soto-Alvaredo, J.; López-Chaves, C.; Sánchez-González, C.; Montes-Bayón, M.; Llopis, J.; Bettmer, J. Speciation of gold nanoparticles and low-molecular gold species in Wistar rat tissues by HPLC coupled to ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2017**, *32*(1), 193-197.
39. López-Sanz, S.; Rodríguez, N.; Serrano, R.; Rodríguez, R. C.; Ríos, A. Methodology for monitoring gold nanoparticles and dissolved gold species in culture medium and cells used for nanotoxicity tests by liquid chromatography hyphenated to inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Talanta* **2017**, *164*, 451-457.
40. Rývolová, M.; Táborsky, P.; Vrábek, P.; Krásenský, P.; Preisler, J. Sensitive determination of erythrosine and other red food colorants using capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography A* **2007**, *1141*, 206-211.
41. Liu, P. J.; Du, J. X. Micellar sensitizing chemiluminescence determination of erythrosine *Chinese Journal of Analysis Laboratory* **2009**, *28*, 9-12.
42. Trandafir, I.; Nour, V.; Ionica, M. E. The liquid-chromatographic quantification of some synthetic colorants in soft drinks. *Scientific Study and Research* **2009**, *1*, 73-82.
43. Ordoudi, S. A.; Tsimidou, M. Z. Consideration of fluorescence properties for the direct determination of erythrosine in saffron in the presence of other synthetic dyes. *Food Additives and Contaminants: Part A* **2011** *28*(4), 417-422.
44. Kaur, A.; Gupta, U. Simultaneous spectrophotometric determination of eosin and erythrosine with Cr(VI) reagent in micellar media using mean centering of ratio spectra. *Chemical Science Transactions* **2012**, *1*(2), 424-430.
45. Pagáčiková, D.; Lehotay, J. Determination of synthetic colours in meat products using high-performance liquid chromatography with photodiode array detector. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* **2015**, *38*(5), 579-583.
46. Nayak, D. S.; Shetti, N. P.; Katrahalli, U. Electrochemical behavior of xanthene food dye erythrosine at glassy carbon electrode and its analytical applications. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* **2015**, *8*(4), 125-129.

47. Shokrollahi, A.; Zarghampour, F. Determination of erythrosine in food samples by CPE-scanometry as a new method and comparison with spectrophotometric results. *Analytical and Bioanalytical Chemistry Research* **2016**, *3*(2), 159-168.
48. Mahajan, P. G.; Bhopate, P. D.; Kolekar, G. B.; Patil, S. R.; Flour, J. FRET sensor for erythrosine dye based on organic nanoparticles: application to analysis of food stuff. *Journal of Fluorescence* **2016**, *26*(4), 1467-1478.
49. Shokrollahi, A.; Pili, H. B.; Doust, K. H. Microspectrophotometric determination of erythrosine in beverage and water samples after ultrasonic assisted supramolecular-based dispersion solidification liquid-liquid microextraction. *Journal of Analytical Chemistry* **2017**, *72*, 617-623.
50. Ozkantar, N.; Yilmaz, E.; Soylak, M.; Tuzen, Y. M. Separation, enrichment and spectrophotometric determination of erythrosine (E127) in drug, cosmetic and food samples by heat-induced homogeneous liquid-liquid microextraction method. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* **2019**, *99*(12), 1135-1147.

IV.2. Development of a novel “turn-off-on” fluorescent (nano)sensor based on riboflavin emission for dual determinations of graphene oxide and catechin in fields of interest

Submitted to ACS Applied Materials and Interfaces



Schematic illustration of the competitive adsorption of riboflavin and catechin for the graphene oxide surface. (A) Riboflavin emission, (B) “turn-off” effect in the presence of GO and (C) fluorescence recovery (“turn-on”) by the displacement of riboflavin from riboflavin-GO platform by catechin.

Development of a novel “turn-off-on” fluorescent (nano)sensor based on riboflavin emission for dual determinations of graphene oxide and catechin in fields of interest

Esther Pinilla-Peñalver, Adrián Esteban-Arranz, Ana M. Contento and Ángel Ríos*

Highlights

- Riboflavin as fluorescent indicator for the detection of GO and catechin.
- Evaluation of the quenching capacity of three GO different structures.
- Influence of the GO-based material thickness on the affinity for riboflavin.
- Fluorescent displacement assay of riboflavin from the GO surface by catechin molecules.
- Sensing strategy for determining both GO and catechin in samples of interest.

Abstract

An optical probing strategy for the detection of graphene oxide (GO) and catechin was developed based on the riboflavin attachment to GO platform and the competitive interactions between riboflavin and catechin, respectively. The emission of riboflavin (fluorescent indicator) was monitored at 524 nm, which was turned-off by the presence of GO when forming the riboflavin-GO system. The fluorescence quenching effect was gradually produced in the presence of the different GO structures previously synthesized with control size and thickness. This fact allowed to quantitatively determinate the three prepared graphene-based structures (large, small and monolayer GO). The results mainly revealed a very large effect as a function of nanomaterial thickness. In the case of large GO, a linear correlation between I/I_0 ratio in the concentration range from 0.6 to 35.4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ was found. The strong affinity between catechin and GO produced the displacement of riboflavin molecules from the riboflavin-GO platform. Consequently, the probe molecules were released into solution with progressively increasing fluorescence. This recovery (switch-on) was dependent on the catechin concentration between 1.0 and 20.8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ with a

detection limit of 0.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The applicability of this fluorescence indicator displacement approach was tested in environmental matrices for GO analysis and catechin determination in food products with promising results.

Keywords

Dual sensing; Quenching fluorescence capacity; Fluorescence recovery; Graphene oxide-based sensor; Lateral dimension, Thickness; Agri-food matrices.

IV.2.1. Introduction

Graphene-based nanomaterials are two dimensional layers composed of a large sp^2 hybridized carbon atoms in a hexagonal configuration. In this broad family is graphene oxide (GO), whose heterogeneous structure is rich in oxygen-containing functionalities such as hydroxyl and epoxy at the basal plane and carboxylic groups at the edges.¹ Unlike graphene, the presence of functional groups in the material involves the presence of sp^3 carbon atoms that widen the optical bandgap, giving rise to fluorescent materials.² GO is typically prepared by the oxidation of graphite with strong acids and other oxidants followed by an exfoliation step. Analogous graphene and reduced graphene oxide (rGO) present lesser or no functionalization (compared to GO) and are, therefore, less stable than GO in aqueous media.³ One of the most advantages of carbon-based materials is their large specific surface area compared with many other nanoparticles.⁴ This physical characteristic makes them suitable for the strongly adsorption with organic molecules *via* non-covalent interactions, π - π interactions, electrostatic forces, van der Waals, hydrogen bonding or hydrophobic interactions.⁵ It is due to their unique properties that graphene-based nanomaterials are increasingly applied in the environment, biomedicine and food safety. Thus, in recent years, GO has been applied in fluorescent sensors not only a fluorophore but also an effective fluorescence quencher,^{2, 6, 7} through either non-fluorescent complex formation, charge transfer or Förster resonance energy transfer (FRET) processes. The limitation to employ GO as a fluorescent label lies in its broad emission peak, which limits the detection performance when the spectral intensity of fluorescence is transduced as a signal.² However, few fluorescence sensors related to the competitive

adsorption of chemically compounds on GO-based materials surface have previously been reported.^{1, 8, 9}

Intensive production of nanomaterials at industrial scale, as well as their commercialization in consumer products, such as electronic devices, cosmetics, food and drugs will increase the human and environmental exposure to such nanomaterials. Their release into the environment could presents several risks to human health and ecosystem,^{3, 10} so, it is necessary to evaluate their possible effects. Specifically, GO nanostructures could reach the environment through atmospheric emissions, transport pollution, and waste from production and research facilities, contaminating the soil, surface and groundwater, even affecting the organisms present there.¹⁰ Therefore, analytical methods are increasingly needed for the characterization and determination of engineered nanomaterials in complex matrices.¹¹ Despite this, some approaches have been developed for the quantification of metallic nanoparticles,^{12, 14} carbon-based nanomaterials^{15, 16} and nanostructured organic materials.^{17, 18} However, to the best of our knowledge, GO-based sensors found in the literature in which GO is used as a quencher do not quantitatively determine the nanomaterial.

Catechin belongs to the representative family of flavonoids, specifically flavan-3-ols, and involves four diastereoisomers, being the most common isomer of catechin the (+)-catechin. Favan-3-ol compounds present diverse beneficial effects related to human health based on antioxidative, anti-inflammatory, anti-microbial, anti-cancer, cardioprotective and neuroprotective properties, among many others.^{19, 20} All the properties of catechin arises from its polyphenolic structure, which enables to exhibit a strong antioxidant activity. Some of the natural sources where catechins are commonly found are fresh tea leaves, red wine, cocoa beans, grapes and raspberries.²¹ As a biologically active compound, this type of flavanol contributes many of the characteristics that make natural products containing them a very valuable component of the human diet. The content of catechins is an important index to evaluate the quality of many food products such as tea or cocoa, so it is of great importance to determine it in this type of matrix.²² To date, the determination of catechin content in food samples was mostly carried out based on high-performance liquid chromatography-UV/fluorescent detection (HPLC-UV/FL), gas chromatography-

mass spectrometry (GC-MS) and capillary electrophoresis-UV (CE-UV).²³⁻²⁷ However, HPLC-DAD/FL, GC-MS or CE-DAD require complex separation and determination systems and long analysis times. Compared with the above methods, fluorescence technology is highly efficient and easy to operate and has become an effective method in routine analysis.²²

For both reasons mentioned, a novel turn-off-on fluorescence approach based on the affinity of a fluorescent essential vitamin (B₂), riboflavin, for GO surface in comparison with catechin was developed. GO showed to act both as an effective nanoquencher and as a highly selective nanoadsorbent. This fact allowed its quantification, being of great relevance since at present the development of techniques and methodologies for the determination and quantification of nanomaterials is still very necessary. Moreover, this report demonstrated the competitive interactions between GO and riboflavin or catechin allowing the flavonoid detection. The applicability of this strategy for both GO and catechin determination in environmental and food matrices was successfully carried out.

IV.2.2. Materials and methods

IV.2.2.1. Chemicals and reagents

All aqueous solutions were prepared with analytical grade reagents and deionized water purified with a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA) that achieves a resistivity of 18.2 MΩ cm at 25 °C. Riboflavin (RIB, ≥ 98.0%), (+)-catechin hydrate (CAT, ≥ 98.0%), 4-morpholineethanesulfonic acid hydrate (MES, ≥ 99.5%), sodium hydroxide (98.0%), nitric acid (70.0%, purified by redistillation, ≥ 99.9% trace metals basis), sulfuric acid (99.9% purity), sodium nitrate (99.9% trace metals basis), potassium permanganate (ACS reagent, ≥ 99.0%), graphite powder (< 20 μm, synthetic), and hydrogen peroxide (contains inhibitor, 30 wt. % in H₂O, ACS reagent) were acquired from Sigma Aldrich (Madrid, Spain) and non-pyrogenic water was purchased from Scientific Laboratory Supplies (Nottingham, UK).

For interference study, folic acid (≥ 99.0%), *L*-lysine monohydrochloride (≥ 98.0%), *L*-cysteine (≥ 98.5%), *L*-alanine (≥ 98.0%), *L*-glutamic acid (≥ 99.0%),

D-(+)-glucose anhydrous ($\geq 99.5\%$), *D*-(-)-fructose ($\geq 99.0\%$), *D*-(+)-saccharose ($\geq 99.5\%$), *DL*-malic acid ($\geq 99.0\%$), sodium chloride ($\geq 99.5\%$), magnesium sulphate ($\geq 99.5\%$), potassium carbonate ($\geq 99.0\%$), mercuric chloride ($\geq 99.5\%$), ammonium nitrate ($\geq 99.0\%$) were also acquired from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). *L*-ascorbic acid ($\geq 99.7\%$), citric acid anhydrous ($\geq 99.5\%$), sodium phosphate dibasic ($\geq 98.0\%$), hydrochloric acid (37%) and diethyl ether ($\geq 99.5\%$) were purchased from PanReac (Barcelona, Spain). Paraquat dichloride ($\geq 99.9\%$) and (-)-epicatechin ($\geq 90.0\%$) were obtained from Fluka Chemie (Buchs, UK).

IV.2.2.2. Instrumentation

Fluorescence spectra were acquired on a QuantaMaster40 spectrofluorometer from photon technology international (PTI) equipped with a 75 W continuous xenon short-arc lamp using a detector voltage of 981 V. SOC-10 USB interface FelixGX software was used to collect and process fluorescence data. Emission and excitation slit widths were both 2 nm unless otherwise specified and a 3 mm quartz cuvette was used. For the determination of the luminescence lifetime of the species, the fluorescence decay was also measured on a PTI Time Master fluorimeter equipped with a picosecond nitrogen laser and a wavelength selector. This system was used with the dye 2-[1,1'-biphenyl]-4-yl-5-[4-(1,1'-dimethylethyl)phenyl]-1,3,4-oxadiazole (BPBD). The stroboscopic detector was coupled to a Czerny–Turner monochromator on the emission port. The system was connected to a personal computer via an ethernet interface and governed by Felix32. The instrumental parameters used were as follows: $\lambda_{\text{exc}} = 368$ nm and $\lambda_{\text{em}} = 524$ nm, 300 channels, integration time = 50 μs , 10 averages per decay, 5 shots per channel, laser pulse frequency = 5 Hz, 5 nm excitation and emission slit widths, and a logarithmic collection step.

Absorption spectra were recorded in a UV-Vis spectrophotometer (SECOMAM UVI Light XS 2), equipped with a LabPower (V3-50) for absorbance data acquisition, along the 200 – 800 cm^{-1} spectral range. A 10 mm quartz cuvette was used for absorbance experiments. All measurements were performed at room temperature.

X-ray diffraction (XRD) experiments were performed in a Philips X'Pert MPD diffractometer at 40 mA and 40 kV with Cu K α 1 (1.54056 Å) radiation. A zero-background sample holder was used to deposit freeze-dried GO materials to make sure there was not any interference from the background. Raman spectra were acquired from 1000 to 2000 cm⁻¹ by a Renishaw, InVia spectrometer. A 532 nm 1% power laser was used with a 50x magnification. 15 measurements per sample were recorded and their standard deviation values were calculated and incorporated into the results. OriginPro 8.5 software was used to normalize spectra by the intensity of the graphitic band (G). Scanning transmission electron microscopy (STEM) experiments were carried out to define materials morphology and lateral dimensions. A GeminiSEM 500 from the ZEISS brand was used in the STEM mode. Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR) was used to elucidate GO surface chemistry. FT-IR experiments were performed on a Shimadzu IR instrument, IR-Affinity-1S model with a DTGS Standard detector. Samples were placed in an attenuated total reflectance (ATR) crystal of ZnSe and the measurements were acquired from 4000 to 450 cm⁻¹, with a 4 cm⁻¹ resolution and 45 scans per sample. Results were repeated three times.

The pH of all aqueous solutions was measured using a Basic 20 pH-meter combined with a combined glass electrode (Crison Instruments S. A., Barcelona, Spain). An ultrasound bath (J. P. Selecta, Barcelona, Spain), a microcentrifuge Minicen (Ortoalresa S. A., Madrid, Spain), a freeze dryer LyoQuest (Telstar, Barcelona, Spain) and a vortex stirrer V05 series (LBX instruments, Madrid, Spain) with speed control were also used.

IV.2.2.3. Synthesis of graphene oxide materials

In this work, three graphene oxide-based materials with control lateral dimensions and thicknesses were synthesized. Large graphene oxide (lGO) was produced following an experimental procedure described elsewhere.²⁸ In this case, the synthesis protocol followed a modified Hummers methodology. After the oxidation procedure, larger graphene oxide flakes were concentrated to the top of the graphitic residue by centrifugation and then removed by their solubilization with

warm water. Next day, two rounds of purification steps were carried out by centrifugation. Additionally, small graphene oxide (sGO) flakes were produced after the sonication of lGO for 5 min and a posterior purification step by centrifugation. This methodology was reported by F. Rodrigues et al.²⁹ This study demonstrated the possibility to obtain smaller graphene oxide flakes with similar physicochemical characteristics as lGO only differing in their lateral dimensions. Finally, monolayer graphene oxide (mlGO) flakes were collected from the washing fraction prior the concentration of lGO.³⁰ The concentrations obtained for each of the GOs were 2.83, 2.50 and 0.45 mg mL⁻¹ of lGO, sGO and mlGO, respectively. After their synthesis, GO solutions were frozen by liquid nitrogen at -77 K and sublimated at 0.005 mbar for 3 days.

IV.2.2.4. Fluorescence spectra analysis and analytical procedure

Working solutions of lGO (0.42 mg mL⁻¹), sGO (0.47 mg mL⁻¹) and mlGO (0.45 mg mL⁻¹) were prepared from stock solutions in deionized water. A 265.7 μM (100 μg mL⁻¹) stock solution of riboflavin was prepared in deionized water and diluted to 20 μM to prepared the working solution. The stock solution of riboflavin was prepared by sonication. The analytical procedure for GO determination was carried out as follows: 1 μM (0.38 μg mL⁻¹) of riboflavin was mixed with increasing concentrations of GO materials, at pH 7.5 fixed with 15 mM MES buffer. In this sense, 15 μL of riboflavin solution (7.5 μg mL⁻¹, 20 μM), 45 μL MES (0.1 M, pH 7.5) were mixed with GO aliquots of 240 μL of gradual concentrations (standards and samples), achieving a total volume of 300 μL. The mixtures were then vortexed and interacted for 3 min at room temperature to obtain the riboflavin-GO complex and measured. GO analyses were performed in the same way for all three materials. The fluorescence emission intensities of each sample in the absence (I_0) and presence (I) of GO (ml-, s- and lGO) were recorded at 524 nm, exciting at 368 nm. The fluorescence extinction efficiency of free riboflavin, expressed as (I_0/I), was used as analytical signal for GO determination.

To catechin determination, the concentration of riboflavin-lGO nanoplateform was constant and fixed to 1 μM of riboflavin and 126.1 μg mL⁻¹ of lGO

(corresponding to maximal quenched riboflavin signal). Specifically, to carry out these experiments 15 μL of riboflavin solution ($7.5 \mu\text{g mL}^{-1}$, $20 \mu\text{M}$), 90 μL of IGO solution (0.42 mg mL^{-1}) and 45 μL MES (0.1 M , pH 6.5) were mixed with aliquots of 150 μL samples-containing different concentrations of catechin, to complete a total volume of 300 μL . Then, the mixtures were allowed to interact for 1 min at room temperature before measuring the emission signals at the same wavelength, exciting at 445 nm. The fluorescence recovery efficiency of free riboflavin, expressed as the ratio between the fluorescence of riboflavin-IGO complex in the presence (I) and absence (I_0) of catechin, was used as analytical signal.

Control experiments to verify that the switch-off-on of riboflavin emission was produced by the different affinities between the competitors (riboflavin and catechin) for GO were following the same protocol, replacing GO by deionized water.

IV.2.2.5. Quantification of catechin by capillary electrophoresis

A previously validated electrophoretic procedure was used as a comparative analysis method for catechin quantification. The conditions of the CE procedure were previously evaluated to achieve the best separation efficiency for the desired analyte since the cocoa matrix is complex and contains interferents. The electrophoretic separation was carried out in the positive polarity mode applying a voltage of 10 kV at 25 °C. Standards and samples were injected by hydrodynamic injection mode for 15 s at 40 mbar. Detection was recorded at 245 nm. Aqueous buffer solution used for the separation of catechin from the other compounds consisted of 50 mM anhydrous sodium tetraborate at pH 9.5.

IV.2.2.6. Preparation of riboflavin-graphene oxide nanoplatfom for characterization

FT-IR and Raman analyses were carried out to elucidate the possible interaction between riboflavin and GO to form the nanoplatfom. The different complexes (1 – 3) were prepared by mixing 1 μM riboflavin with 126.1, 42.0 or 14.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of IGO, respectively. These solutions were fixed at pH 7.5 with 15 mM MES buffer solution.

Previously, a calibration curve of the free riboflavin emission signal at 524 nm (λ_{exc} 368 nm) was prepared between 0.05 and 1.00 μM . Once the previous samples were prepared, a control of them was followed by fluorescent measurements to quantify the free riboflavin. Excess free riboflavin in solution was removed from the complex by the necessary centrifugation processes at 10,000 rpm for 7 min. The supernatant was removed, and the complex was washed with deionized water. Depending on the complex, this process was repeated so many times until no free riboflavin was detected in the solution.

Finally, the samples were frozen by liquid nitrogen at -77 K and sublimated at 0.005 mbar for 3 days and were subjected to the characterization techniques.

IV.2.2.7. Samples treatment

Waters of different origin and a soil were chosen as environmental samples for the determination of GO. To simulate samples of river, drinking, well and seawater contaminated with the nanomaterial, the environmental samples were fortified at four lGO concentration levels between 1.1 and 4.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The same treatment was followed for all samples. Thus, 2 mL of sample doped with each of the lGO concentrations were centrifuged for 7 min at 10,000 rpm. After that, 1.7 mL of the supernatant were carefully removed, remaining 300 μL of GO sample. Finally, after this pre-concentration step, samples were directly subjected to the analytical procedure previously described in section “*Fluorescence spectra analysis and analytical procedure*”. In the case of soil, 0.3 g portions were spiked with different concentrations of lGO from 23.8 to 88.2 $\mu\text{g g}^{-1}$ and left them to dry. Once the samples were dried, each of these portions was suspended in 1 mL of deionised water. This mixture was kept under continuous stirring for 5 min and subsequently allowed to settle until the supernatant was as clear as possible. Each obtained supernatant was subjected to the analytical procedure for the determination of lGO concentration. All samples were analysed in triplicate.

The determination of catechin was carried out in several food matrices, such as beverages (red wine and green tea) and cocoa beans. Different concentrations of catechin between 10.0 and 36.6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ were added to a liquid green tea sample,

already prepared and bought in a local supermarket. This sample was previously 1:2 diluted with deionized water. 5 mL of spiked green tea were extracted with 2 mL diethyl ether to get rid of some unknown food additives. This extraction procedure was repeated three times. Finally, aqueous samples were subjected to the analytical process by triplicate.

The red wine sample was spiked at the same concentrations levels as the green tea. The treatment of this sample followed the sample procedure as for the tea samples, except that this sample was previously diluted 3 times.

On the other hand, roasted cocoa sample (Ocumare de la Costa, Venezuela) was treated as follows: the beans were crushed with a mortar until a uniform powder was obtained to achieve a better contact with the extractant mixture. 0.5 g of this powder were treated with 5 mL of an ethanol:water mixture (50:50, v/v), then sonicated for 20 min and, subsequently, the suspension was filtered through a cellulose membrane. The remaining cocoa powder was treated again with 5 mL of the extractant mixture, the suspension was then sonicated and finally filtered. Each one of the obtained extracts was directly subjected to the proposed analytical method and electrophoretic one (see the experimental conditions in section “*Quantification of catechin by capillary electrophoresis*”) to estimate the catechin concentration in the sample. In addition, the cocoa sample was fortified at 2 concentration levels of catechin, 30.24 and 69.72 $\mu\text{g g}^{-1}$, and the procedure was followed.

IV.2.3. Results and discussion

IV.2.3.1. Characterization of graphene oxide-based structures

Three graphene oxide-based structures with controlled lateral dimensions and thicknesses were synthesized by the Hummers procedure.²⁸⁻³⁰ Their physicochemical characteristics were exhaustively studied as detailed below. XRD analyses were carried out to elucidate the structural features of the synthesized materials. Graphitic materials always present a well-defined peak at $2\theta \sim 25 - 26^\circ$ values characteristic of their (002) plane.⁴ However, results of the synthesized graphene oxide-based materials plotted in **Figure IV.2.1a** do not show this specific plane, demonstrating their high

purity after the oxidation treatment and change of hybridization. Small graphene oxide (sGO) and large graphene oxide (lGO) diffractograms display a peak related to the (001) plane at $2\theta \sim 11 - 12^\circ$. This shift in their 2θ values has already been reported as a consequence of water and oxygen functional groups incorporation between their layers after the oxidation procedure. In addition, this interlaminar space has previously been used to intercalate compounds for different applications, such as adsorption and catalysis.⁵ Unlike lGO and sGO, no peak of any plane is clearly visible in the monolayer graphene oxide (mlGO) diffractogram, demonstrating its lack of crystalline character, and showing a more exfoliated and thinner structure in comparison to the other two materials.

Figure IV.2.1b compiles Raman results of the different materials. Typical and similar spectra have been detected. Two bands are distinguished between 1000 and 2000 cm^{-1} , the D-band at 1351 cm^{-1} , which describes the hybridized carbon disorder that is present in the GO, and the G-band located at 1598 cm^{-1} that is designated to sp^2 -carbon atoms. The ratio between their intensities (I_D/I_G) has already been designated as a parameter to establish their degree of defects.³¹ Based on D. López-Díaz classification,³² these GOs can be considered as low-defected graphene based-materials because they exhibit I_D/I_G values between 0.90 – 0.91, I_D/I_{G-lGO} (0.91) = I_D/I_{G-sGO} (0.91) \approx I_D/I_{G-mlGO} (0.90). In this sense, lGO and sGO display very similar results, being in agreement with F. Rodrigues et. al outcomes.²⁹ On the other hand, mlGO is characterized by a slightly less defected structure in comparison to the other two GOs.

STEM experiments were carried out to define the morphology and size of the different GOs. Micrographs acquired are compiled in **Figure IV.2.1c**. Materials show defined flat structures typical of this kind of materials. The freeze-drying methodology used to dry the GO solution has permitted to obtain a less compacted material. Regarding the size of the materials, sGO flakes displays smaller (400 – 1200 nm) lateral dimensions than lGO (5 – 20 μm) and mlGO (5 – 25 μm). It has been seen that these materials have different thicknesses where that of sGO is 1.1 – 2.4 nm, that of lGO is 1.2 – 4.5 nm and that of mlGO is 0.6 – 0.9 nm.³⁰ This suggests the monolayer structure of mlGO and multilayer ($n \geq 2$) of s- and lGO.

FT-IR was used to determine the surface chemistry of these materials. All of them present the same type of oxygen functional groups. Results are depicted in **Figure IV.2.1d**. They show a band centered at $\sim 1725\text{ cm}^{-1}$ that is related to the stretching vibration of -C=O groups typically assigned to the existence of carboxylic groups. Fact that is verified by the presence of a shoulder at $\sim 3612\text{ cm}^{-1}$ assigned to free hydroxyl groups.³³ In addition, a broad band from 2920 to 3620 cm^{-1} designated to -OH groups is also found. Additionally, the band centered at $\sim 1620\text{ cm}^{-1}$ is related to the aromatic domain, sp^2 carbon, of the material that is connected with hydroxyl groups in acidic surfaces.³⁴ On the other hand, the change of hybridization is corroborated by the existence of a sharp band at 1065 cm^{-1} .³⁵ Finally, -C-H groups in aromatic structures can be established because of the existence of bands below 950 cm^{-1} .³⁶

Fluorescence emission and UV-Vis absorbance results of the synthesized materials are plotted in **Figure IV.2.1e** and **IV.2.1f**, respectively. The main band of absorbance is located at 230 nm , which is characteristic of $\pi \rightarrow \pi^*$ transitions from sp^2 carbon domains. Additionally, a shoulder associated with $n \rightarrow \pi^*$ transitions of free electrons present in the oxygen atoms of their carbonyl and carboxyl surface functional groups, is visible at 300 nm .³⁷ Regarding the fluorescence emission results ranging from 370 to 570 nm , it can be seen that lGO and sGO display similar optical properties, however a bathochromic shift is found for mlGO.

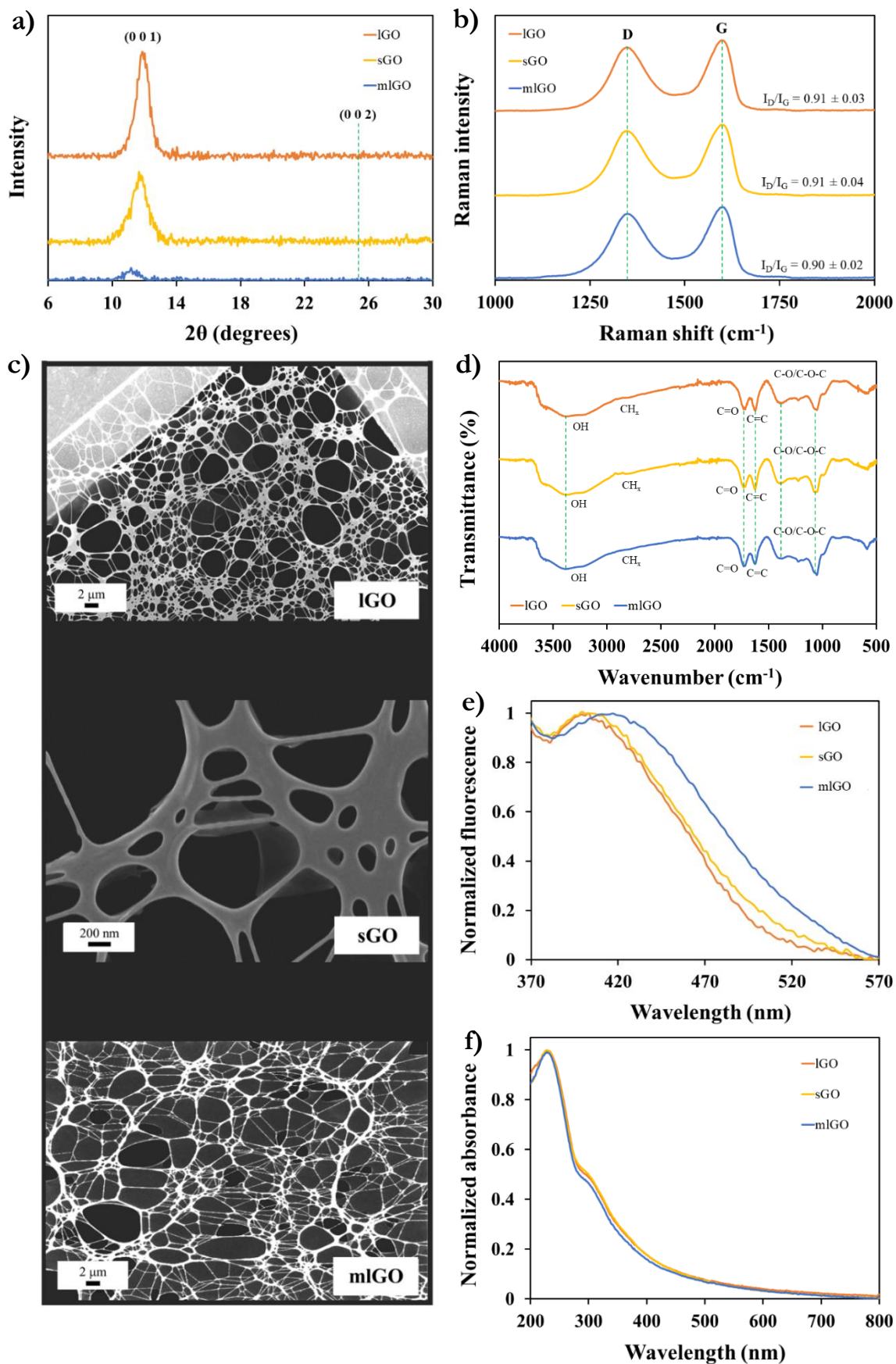


Figure IV.2.1. (a) XRD diffractograms, (b) Raman profiles, (c) STEM micrographs, (d) FT-IR results, (e) UV-Vis and (f) fluorescence spectra of IGO, sGO and mlGO structures.

IV.2.3.2. Strategy for both GO and catechin detection

The novel sensing for determining GO and catechin that is proposed in this work is based on the competitive interactions between GO (host) and riboflavin or catechin (competing guests). Thus, this proposal is known as indicator displacement assay. Riboflavin was selected as fluorescent indicator which displays two excitation bands located at 368 and 445 nm and a strong emission signal which maximum occurred at 524 nm (**Figure IV.2.2**).

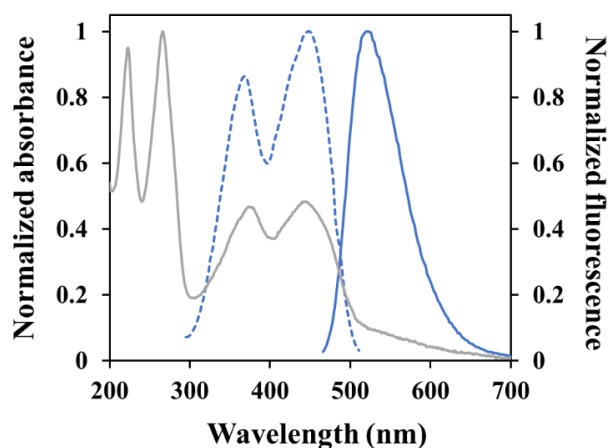


Figure IV.2.2. Absorption (grey line) and fluorescence (blue line, dotted for excitation and solid for emission) spectra of riboflavin aqueous solution.

In contrast, GO and catechin spectra show a very low emission at 524 nm even at high concentrations, thus, these spectral contributions are not significant at the excitation conditions. This emission band is monitored at 524 nm for indirectly sense GO and catechin based on a fluorescence turn-off-on effect. Both exciting wavelengths were selected to analyse the effect of both species over the riboflavin emission for obtaining the best sensitivity. Firstly, the adsorbent and fluorescence quenching properties of the three-graphene oxide-based nanostructures of controlled size and thickness (mlGO, sGO and lGO) towards riboflavin as dye probe were evaluated. As shown in **Figure IV.2.3a**, riboflavin fluorescence intensity was progressively decreasing as it interacts with increasing concentrations of all nanomaterials used,¹ allowing the GO sensing. The fluorescence intensity of riboflavin decreased dramatically as the GO concentration increased but then decreased more moderately at higher concentrations of GO, describing a polynomial

fit for the three GO structures. This could be due to the fact that initially there are more accessible adsorption gaps in the graphene oxide-based sheets and, therefore, the process would be faster, however as these gaps are more filled, the interaction process slows down. The efficiency of quenching effect is more pronounced as GO concentrations increase (I_0/I). Specifically, the fluorescence of 1 μM riboflavin solution can be inhibited up to ca. 93% in the presence of 126.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ lGO, which means that almost all indicator molecules are adsorbed onto the active centres of the nanolayers. Riboflavin fluorescence is not maximally inhibited because although the riboflavin-GO complex is being formed, there is probably a little dissociation of the complex leaving a small proportion of both free riboflavin and GO. Therefore, GO sensing is the result of indirectly measurements of the fluorescence of the remaining free riboflavin when forming the complex. Similar quenching profiles were observed in the case of l- and sGO, being very different that produced by mlGO as can be seen in the curves of **Figure IV.2.3a**. The slope of fitting curve for the riboflavin and lGO is the clearly the steepest one, so it can be concluded that the fluorescence quenching efficiency of the dye by GO materials is lGO > sGO > mlGO. This fact indicates that riboflavin has a higher affinity for lGO to form the complex (the formation constant obtained for this complex will be higher than for the other materials). In view of this results, it is noteworthy that such fluorescence extinction effect is much more intensified using a multilayer GO than a monolayer structure at the same concentration. In other words, there is a very large effect depending on the thickness of the nanomaterial. It can also be established that smaller lateral GO flakes do not present better results than larger graphene oxide-based materials. The inferiority on fluorescence quenching capacity of sGO with respect to lGO may be attributed to fewer sp^2 domains into sGO structure.³⁸ At the same weight of carbon content, many sGO sheets contain fewer sp^2 domains than that of an lGO sheet. These results are in agreement with previous reports based on the fluorescence quenching of small-molecule dyes by GO with different lateral size.^{38, 39} Thus, to achieve the maximum fluorescence inhibitory effect of 1 μM riboflavin solution, a higher concentration of nanomaterial is needed in the case of mlGO (249.8 $\mu\text{g mL}^{-1}$) than in the case of s- (186.4 $\mu\text{g mL}^{-1}$) or lGO (126.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Therefore, for reasons of sensitivity, lGO was selected to design the riboflavin-GO nanoplatform for catechin sensing to

conditions at which the presence of free riboflavin is not practically detectable. The consecutive addition of catechin to the previously formed riboflavin-GO complex led to a gradual recovery of dye emission, as observed in **Figure IV.2.3b**. The turn-on effect of the riboflavin fluorescence signal is related to the catechin amount added, suggesting another fluorescence approach for the detection of catechin via fluorescence indicator displacement assay. Thus, riboflavin, which in its free form presents a strong fluorescence, when it is attached to GO is turned-off and can re-ignite in the presence of catechin that releases it from the complex when forming the new riboflavin-GO-catechin composite. These results suggest the greater affinity of catechin for GO surface in comparison to riboflavin. The maximum fluorescence of riboflavin that can be recovered from its displacement from lGO was achieved in the presence of $108.3 \mu\text{g mL}^{-1}$ of catechin. The initial concentration of free riboflavin was $6.1 \cdot 10^{17}$ molecules mol^{-1} , while $2.2 \cdot 10^{20}$ molecules mol^{-1} of catechin were required to replace the maximum number of riboflavin molecules from the complex. It can be deduced that the release of riboflavin into solution in the presence of catechin is not in a 1:1 ratio. This may be logical since catechin molecules are structurally smaller than riboflavin, being more accessible to the GO active centers due to their less steric hindrance. Therefore, it is considered that many catechin molecules are necessary to replace one of riboflavin.

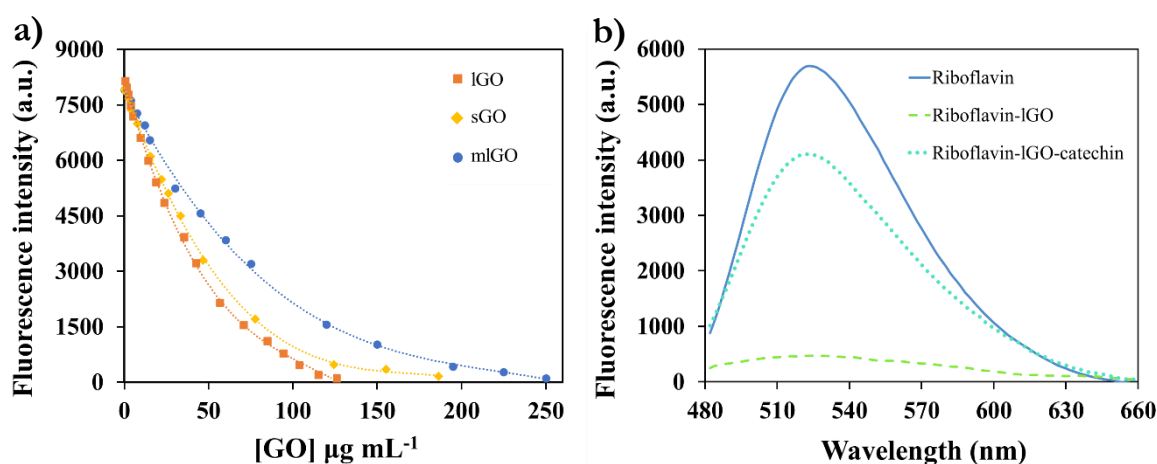


Figure IV.2.3. (a) Effect of the GO types concentration on the riboflavin fluorescence to form riboflavin-GO systems. The solutions were prepared in 15 mM MES buffer at pH 7.5. Detection was performed at 524 nm (λ_{exc} 368 nm). (b) Fluorescence emission spectra of riboflavin in MES buffer solution at pH 6.5 under different conditions (λ_{exc} 445 nm, λ_{em} 524 nm). The concentration of each of the species was 0.4, 126.1 and $108.3 \mu\text{g mL}^{-1}$ for riboflavin, lGO and catechin, respectively.

As can be seen in **Figure IV.2.4**, the capability of lGO to adsorb riboflavin decreases as the concentration of catechin present in the medium increases. This indicates the lower affinity of the material for riboflavin than for catechin. The fluorescent behavior observed by the developed procedure it is justified in this way, since there is a progressive increasing amount of free riboflavin to the solution. Thus, the new turn-on effect allows the sensing of catechin.

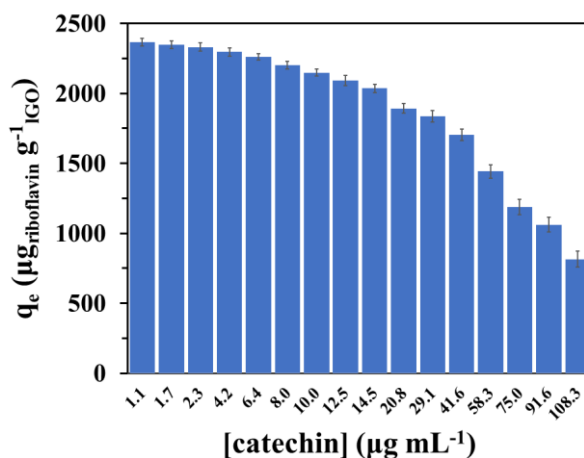


Figure IV.2.4. Adsorption capability of lGO for riboflavin in the presence of different catechin concentrations between 1.1 and 108.3 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Furthermore, the effect of catechin on the fluorescence signal of riboflavin in the absence of GO was also evaluated. Control experiments were performed to verify that the return of the emission intensity was produced by the releasing of riboflavin from the complex by catechin, instead of by interactions between catechin and riboflavin. As expected, there was no spectroscopic overlap between catechin and riboflavin signals which indicates that there was no signal additivity after exciting at 445 nm (**Figure IV.2.5a**). Moreover, the addition of increasing concentrations of catechin from 4.2 to 62.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ to 1 μM riboflavin solution revealed that there was a negligible effect on the initial fluorescence signal of the dye, as observed in **Figure IV.2.5b**. This fact demonstrates that there was no interaction between both species in the absence of GO flakes. Thus, it can be stated that the riboflavin fluorescence recovery was attributed to the replacement of riboflavin molecules for catechin ones on the surface of lGO, to form a new complex catechin-GO, leaving riboflavin free in the solution and regaining its strong fluorescence as there is more catechin in the medium.

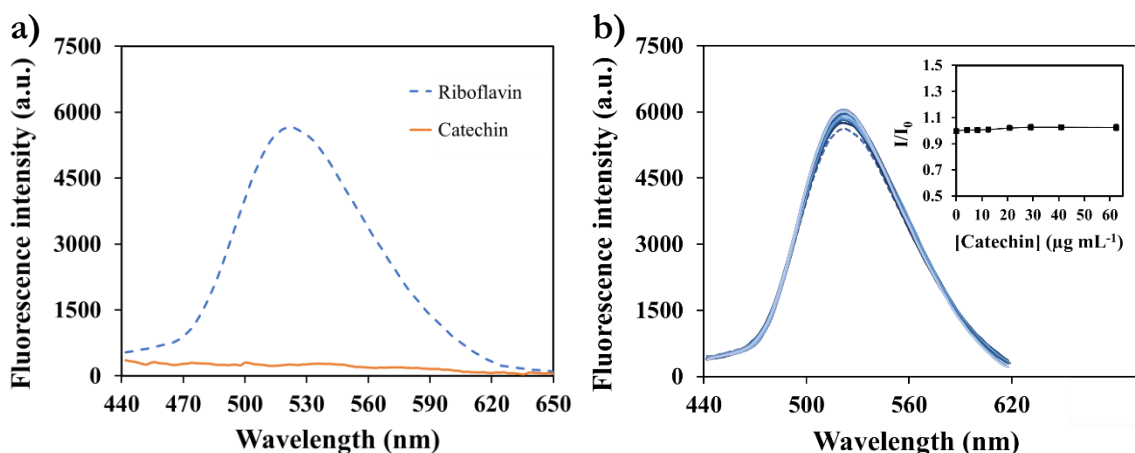


Figure IV.2.5. (a) Emission profiles of riboflavin and catechin. The concentration of riboflavin was $0.38 \mu\text{g mL}^{-1}$ and the catechin was $62.5 \mu\text{g mL}^{-1}$, λ_{exc} 445 nm and λ_{em} 524 nm. (b) Effect of catechin concentration on the fluorescence of riboflavin. The concentration of riboflavin was $0.38 \mu\text{g mL}^{-1}$, 15 mmol L^{-1} MES, pH 6.5, 3 min interaction time, λ_{exc} 445 nm and λ_{em} 524 nm. Inset is represented the I/I_0 ratio against different concentration of catechin.

IV.2.3.3. Optimization of experimental parameters for GO and catechin sensing

IV.2.3.3.1. GO sensing optimization

The performance of the proposed probe system for determining GO was affected by related factors including the pH and ionic strength, concentration of the indicator and the interaction time of the system. These factors were examined in order to obtain the highest sensitivity in the detection. The first experimental variable studied that could influence the sensing of GO was the pH. The cationic form of riboflavin is non-fluorescent, and the anionic form has a low fluorescence quantum yield. Only the neutral form of riboflavin is highly fluorescent.⁴⁰ Thus, the evaluated pH range was ranged between 3.5 and 8.0. The relationship between the fluorescence extinction efficiency, expressed as I_0/I (where I_0 and I are the riboflavin emission intensities in the absence and presence of GO, respectively) was used as analytical signal. The highest I_0/I signal ratio was found at pH 7.5, while fixing a lower or higher pH value produced lower interaction between riboflavin and the GO-based nanomaterial (**Figure IV.2.6a**). Thus, pH 7.5, initially fixed with 25 mM MES as buffer, was selected for the following optimization parameters. After that, it was examined how the ionic strength, influenced by MES buffer concentration, affected

the analytical signal in the 5 – 40 mM range (**Figure IV.2.6b**). In this case, very insignificant differences (< 3%) were observed between 15 and 25 mM, while higher concentrations disfavoured the I_0/I ratio, as well as those below 10 mM. This behavior can be explained in terms of salting-in and salting-out effects.⁴¹ In view of the results, it is not worth adding 25 mM of buffer if practically half of the concentration produces a very similar effect. Therefore, 15 mM was chosen as the minimum concentration of MES that implied the greatest interaction between riboflavin and GO. On the other hand, riboflavin concentration from 0.5 to 10 μM was also investigated (**Figure IV.2.6c**). A constant concentration of GO was established ($47 \mu\text{g mL}^{-1}$) to interact with the dye indicator. Then, the magnitude of the fluorescent extinction produced by the nanomaterial on the riboflavin emission intensity was evaluated. Results revealed that as the riboflavin concentration was lower, the I_0/I ratio increased considerably. The effect produced between concentrations from 10 to 2.5 μM was quite similar. The fixed GO concentration practically inhibits the 0.5 μM riboflavin fluorescence. However, concentrations below 1 μM of the probe emitted a rather noisy fluorescence signal. Therefore, and as a compromise between both factors, 1 μM was selected as the lowest riboflavin concentration that presents a considerable fluorescent signal for detection. In addition, the effect exerted by different GO structures, with different thickness and lateral size, was evaluated under the previously selected conditions which were studied based on the multilayer and larger size GO, lGO. To the best of our knowledge, size-dependent (in terms of lateral dimensions and thicknesses) fluorescence quenching capacity of GO has not been studied. Defining the affinity between riboflavin and GO structure as the maximum quenching capacity, four concentration levels of GO were initially tested for each nanomaterial (ml-, s- and lGO), specifically 12, 24, 36 and 48 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As shown in **Figure IV.2.6d**, at the lowest concentration of GO, similar quenching capacity was found for all of them. As the concentration of the quencher increases to 24 $\mu\text{g mL}^{-1}$, the fluorescence extinction efficiency is enhanced, being clearly maximum for multilayer GO materials. However, at this concentration level it is not yet possible to distinguish which of the two GO with multiple layers (s- and lGO) is the one that produces the greatest interaction. The greatest inhibition effect (I_0/I ratio) of riboflavin fluorescence was found with lGO at higher

concentrations, specifically from 36 $\mu\text{g mL}^{-1}$. This can imply that the attractive interaction between riboflavin and lGO is stronger than that produced by sGO and mlGO. In all cases, the magnitude of the fluorescence quenching effect was dependent on the riboflavin-GO concentration ratio. The gradual improvement of the I_0/I signal with increasing GO concentrations is due to the fact that the more GO there is, the more riboflavin molecules have a chance to bind to the material and the less free riboflavin will remain in the solution, leading to a strong decrease of the fluorescence emission (I) as the riboflavin-GO complex is formed. For reasons of greater sensitivity, lGO was selected as the material to form the riboflavin-GO platform for catechin sensing.

A kinetic study was also carried out to test the interaction time necessary between riboflavin and each GO structure (**Figure IV.2.7**). The maximal analytical signal (I_0/I) was obtained in less than 3 min.

IV.2.3.3.2. Catechin sensing optimization

For catechin sensing, the riboflavin-lGO complex was firstly formed according to the optimal conditions selected above by a titration with lGO solution until the maximal quenching of free riboflavin emission is observed. It is important to avoid excess of the adsorbent material since an excess of its concentration can directly interact with catechin, which will reduce its effective concentration. The maximal quenching effect of 0.38 $\mu\text{g mL}^{-1}$ free riboflavin solution was obtained when 126.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of lGO was added. Once riboflavin-lGO complex was formed at these conditions, it was subsequently used as the nanoplatform for catechin sensing. Thus, several experimental variables that could affect the new sensing strategy, in terms of sensitivity and accuracy, were evaluated. In this case, the ratio between the fluorescence of riboflavin-lGO complex, namely free riboflavin emission intensity after being displaced from the complex, in the presence (I) and absence (I_0) of catechin was used as analytical signal. The pH of the medium was examined in the 3.5 – 8.0 range (**Figure IV.2.6e**), although no relevant differences were found. Therefore, pH 6.5 fixed with MES was the one that showed the highest analytical response. Subsequently, different concentrations of MES buffer between 5 and

30 mM were studied at pH 6.5 (**Figure IV.2.6f**). Once again, the results revealed that 15 mM was the optimal concentration for the sensing of catechin.

The interaction time required for the adsorption of catechin on IGO to occur, resulting in the release of riboflavin from the complex into solution, was also investigated. As can be observed in **Figure IV.2.8**, only 1 min as interaction time is enough after mixing for the full interaction to occur, after this time the I/I_0 signal remains constant.

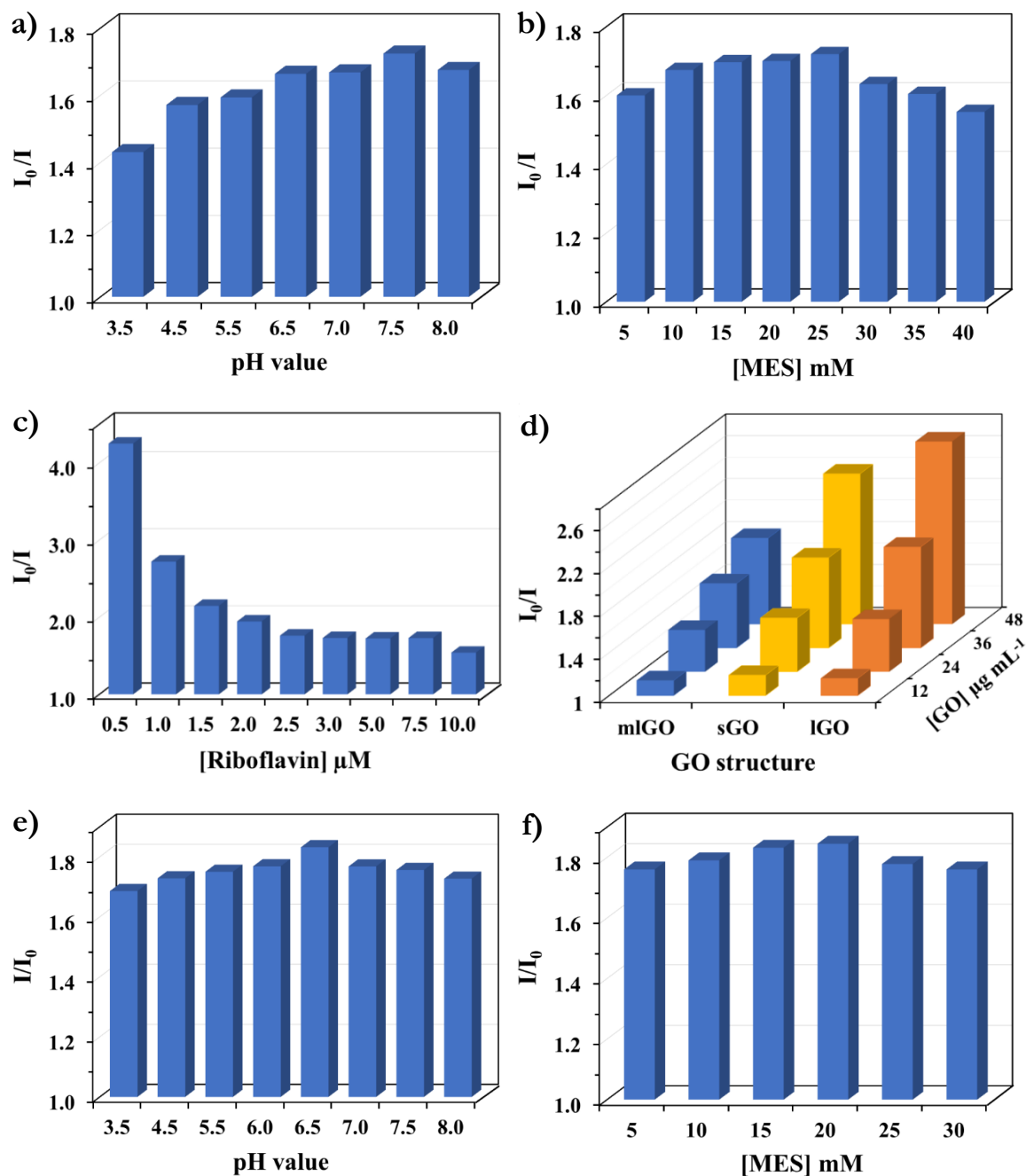


Figure IV.2.6. (a – c) Optimization of the experimental variables for the detection of GO (exciting at 368 nm) and (d – f) catechin (exciting at 445 nm). (a) Influence of pH, (b) buffer concentration and (c) indicator concentration in the formation of riboflavin-IGO complex, expressed as riboflavin fluorescence extinction efficiency (I_0/I). (e) Effect of pH and (f) buffer concentration in the formation of riboflavin-IGO-catechin complex, expressed as riboflavin fluorescence recovery (I/I_0).

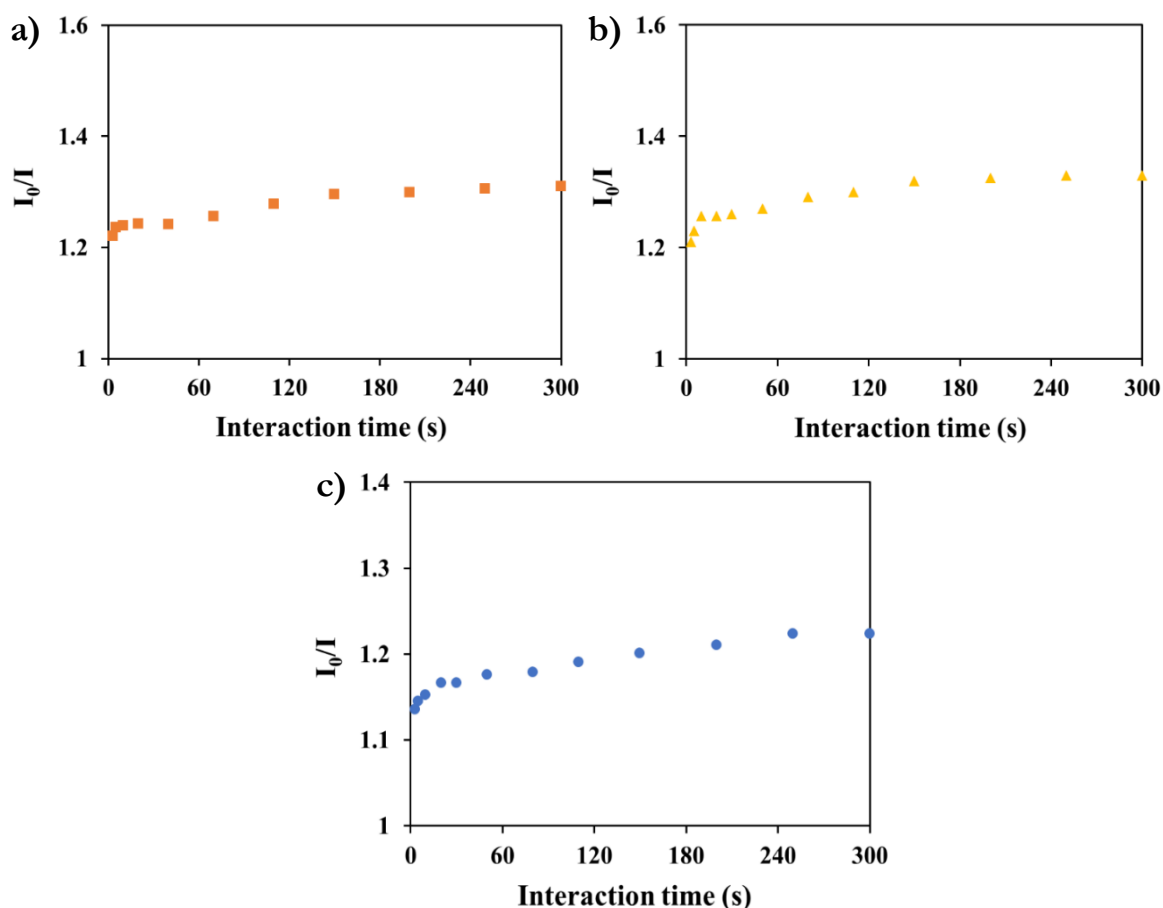


Figure IV.2.7. Kinetic study of the interaction between riboflavin and (a) lGO, (b) sGO and (c) mlGO to form the corresponding complex. The concentration of riboflavin was $0.38 \mu\text{g mL}^{-1}$, $18 \mu\text{g mL}^{-1}$ of lGO, $18 \mu\text{g mL}^{-1}$ of sGO, $16 \mu\text{g mL}^{-1}$ of mlGO, 15 mmol L^{-1} MES, pH 7.5, λ_{exc} 368 nm and λ_{em} 524 nm.

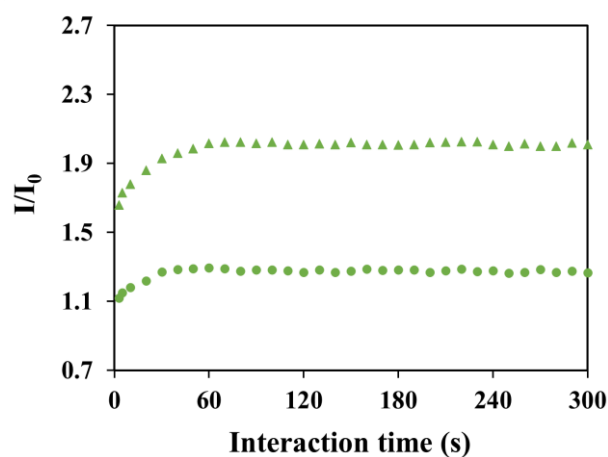


Figure IV.2.8 Kinetic study of the interaction between catechin and riboflavin-lGO complex. The concentration of riboflavin was $0.38 \mu\text{g mL}^{-1}$, $126.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ of lGO, 8 and $35 \mu\text{g mL}^{-1}$ of catechin (circles and triangles, respectively), 15 mmol L^{-1} MES, pH 6.5, λ_{exc} 445 nm and λ_{em} 524 nm.

IV.2.3.4. Characterization of riboflavin-graphene oxide nanoplatform and fluorescence mechanism

As previously shown, the fluorescence emission intensity of riboflavin was gradually decreased with increasing concentrations of GO. It is then demonstrated its potential as an effective nanoquencher and nanoadsorbent of riboflavin fluorophore. Furthermore, IGO did not present any fluorescence at the same excitation wavelength of riboflavin (λ_{exc} 368 nm), confirming that the observed extinction was due to the interaction with the dye and not the result of a reabsorption process.⁶

GO flakes mostly consist in hexagonal ring-based carbon system bearing sp^2 carbon atoms and many sp^3 carbons that hold the oxygen-containing functional moieties.²⁹ Therefore, GO structure would enable to accept electrons from donor compounds⁴² getting adsorbed on its surface probably via π - π stacking interactions. Steady-state emission profiles have demonstrated a strong quenching of riboflavin emission when interacting with GO. Furthermore, **Figure IV.2.9a** shows a little red shift in the maximum emission of the probe, between 524 and 528 nm. This effect is more promoted with the increment of IGO concentration from 0 to 126.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, which seems that riboflavin molecules are strongly adsorbed at the IGO surface via π - π interactions.⁶

The fluorescence quenching of the excited-state riboflavin could take place by different possible processes, such as energy transfer or electron transfer. **Figure IV.2.9b** shows that the emission spectrum of the fluorophore (riboflavin) does not overlap with the absorption of the acceptor (GO), excluding the possibility of the energy transfer process between both compounds to occur.⁴³ Therefore, the quenching effect that is plausible to occur following an electronic transfer process.⁴⁴ The same behaviour on naphthylamide dye with GO was previously reported by Seraj and Rouhani⁶ and on rhodamine B, eosin and methylene blue with graphite oxide and graphene was reported by Liu et col.⁴⁴

To confirm the possible interaction between riboflavin dye and the IGO surface, Raman and FT-IR analyses of the different riboflavin-GO complexes (1 – 3)

at different concentrations (126.1, 42.0 and 14.0 of IGO $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively) were carried out.

I_D/I_G results show the greatest disorder degree (ratio of sp^3/sp^2 carbon) for the complex with more riboflavin adsorbed ($I_D/I_G = 0.98$). Earlier publications have also demonstrated the use of Raman spectroscopy as a tool to define the way that different molecules and carbon-based materials interact.^{45, 46} Thus, the Raman shift values of their G band are compiled and shown in **Figure IV.2.9c** and **Table IV.2.1**. In this sense, results obtained from these riboflavin-IGO complexes corroborate our previous fluorescence outcomes, since the graphitic- sp^2 (G) band of the different complexes shows a visible shift, being maximum for the highest I_D/I_G value. In contrast, no alteration in the D-band shift between complexes has been observed.

Table IV.2.1. Raman results found for free GO and modified with riboflavin.

Sample	I_D/I_G	Raman shift (cm^{-1})
		G band
IGO	0.91	1598.0
Riboflavin-IGO (1)	0.95	1589.6
Riboflavin-IGO (2)	0.95	1592.4
Riboflavin-IGO (3)	0.98	1596.2

FT-IR technique has been previously used as a tool to help elucidating the possible interactions between organic molecules and solid surfaces. In this case, **Figure IV.2.9d** shows the spectrum of the riboflavin dye and its composites formed with the IGO solutions (riboflavin-IGO). The riboflavin spectrum displays main contribution of $-\text{OH}$ functional groups at 3315 and 1240 cm^{-1} . Aliphatic groups are detected by bands at 2932 and 2850 cm^{-1} . The band centered at 1727 cm^{-1} is attributed to $-\text{C}=\text{O}$ stretching vibration of the isoalloxazine ring. Also, the band assigned to the ring $-\text{C}=\text{N}$ stretching vibration is found at 1644 cm^{-1} and the band at 1534 cm^{-1} can be assigned to $-\text{C}=\text{C}-$ group. Additionally, the band at 1062 cm^{-1} is correlated with $-\text{C}=\text{O}$ stretching vibrations. The IGO complexes present representative bands of the dye, proving its presence on the surface of the material. These bands are more pronounced for the riboflavin-IGO (3) complex. The complexes do not show any

new band in respect to the initial lGO spectrum (**Figure IV.2.1d**), revealing that covalent interactions can be ruled out. These findings support previous Raman and fluorescence spectroscopy results, showing that hydrophobic or π - π interactions could be the main driving forces for lGO-riboflavin complexes.

The species used in this study are in solution, which means that there is a high possibility of interactions to be produced between the fluorophore and the fluorescence extingisher. The processes by which quenching can occur are diverse, such as reactions of excited states, energy transfer, complex formation and collision quenching.⁴⁷ The molecular contact between fluorophore and quencher is responsible for the deactivation of the fluorescent emission. The quenching constant obtained by the Stern-Volmer equation (K_{SV}) indicates the sensitivity of the fluorophore to the deactivator. The higher the K_{SV} value, the greater the accessibility of one specie to the other.⁴⁷ As will be discussed below, K_{SV} values of riboflavin-lGO system are considerably higher than those of riboflavin-sGO and riboflavin-mlGO systems. This fact confirms that favourable interactions bring lGO sheets and riboflavin molecules closer together and enhances the quenching efficiency of GO.³⁸ In this case, the units of the K_{SV} and consequently those of the bimolecular quenching constant (K_q) are given in mass-volume and cannot be transformed to molar, which are the units of the reference constant,^{48,49} since we do not know the molecular mass of the nanomaterial. For this reason, this value does not allow us to differentiate between a type and another of quenching mechanism. Sometimes it is not easy to distinguish between one and the other, but it is possible with the measurements of lifetime.⁴⁹

Generally, fluorescence decay can give information related to the excited-state of the fluorophore, being very useful for studying energy transfer- or electron transfer-induced fluorescence quenching. The lifetimes of the riboflavin and riboflavin-lGO complex were found by fitting the decay profiles with one-exponential, being 5.70 ± 0.06 ns (100% \pm 1.1) and 5.13 ± 0.05 ns (100% \pm 1.6), respectively. The values of χ^2 obtained for both decays were 1.01 and 1.07, practically 1, which indicates the fitting perfection of the curve. It is these short lifetimes that differentiates fluorescence from another well-known luminous phenomenon, phosphorescence. The mentioned molecular contact between species can be

produced by a *static quenching* which based on the formation of a non-fluorescent ground-state complex while the *dynamic quenching* results from collisions between the quencher agent and fluorophore during the excited state, producing a rapid recovery to its ground-state without the emission of a photon. It is reported that in case of *static quenching*, the fluorescence lifetime of the fluorophore should not change in the presence of the quencher.⁵⁰ As shown in **Figure IV.2.9e**, the fluorescence lifetime obtained for riboflavin was almost unchanged in the presence of IGO suggesting that the fluorescence change of riboflavin could not be ascribed to the excited state perturbation.⁵¹ Thus, it can be deduced that the occurred effect is mainly referred to as *static quenching* mechanism in which the dye and GO forms a non-fluorescent complex at ground-state and does not rely on diffusion or molecular collisions,⁴⁷ being the *dynamic quenching* little significant in the conditions in which the study was carried out.

The value of the binding constant (K_b) for the formation of the riboflavin-IGO complex and the number of binding sites (n) of the nanomaterial are $1.51 \cdot 10^{-3} \text{ mL } \mu\text{g}^{-1}$ and 1.79 (~ 2), respectively.^{48, 49} These results were obtained from the steady-state fluorescence measurements.

As revealed by fluorescence studies, there is a much higher affinity of catechin for the adsorbent material (IGO) compared to riboflavin, which can be attributed to the size difference and the hydrophilic character. Catechin molecules display smaller size than those of riboflavin, being more accessible to interact with the active centers of GO. In addition, catechin has a lower hydrophilic character than riboflavin due to its higher aromaticity, being this characteristic more favorable for the interaction with GO.

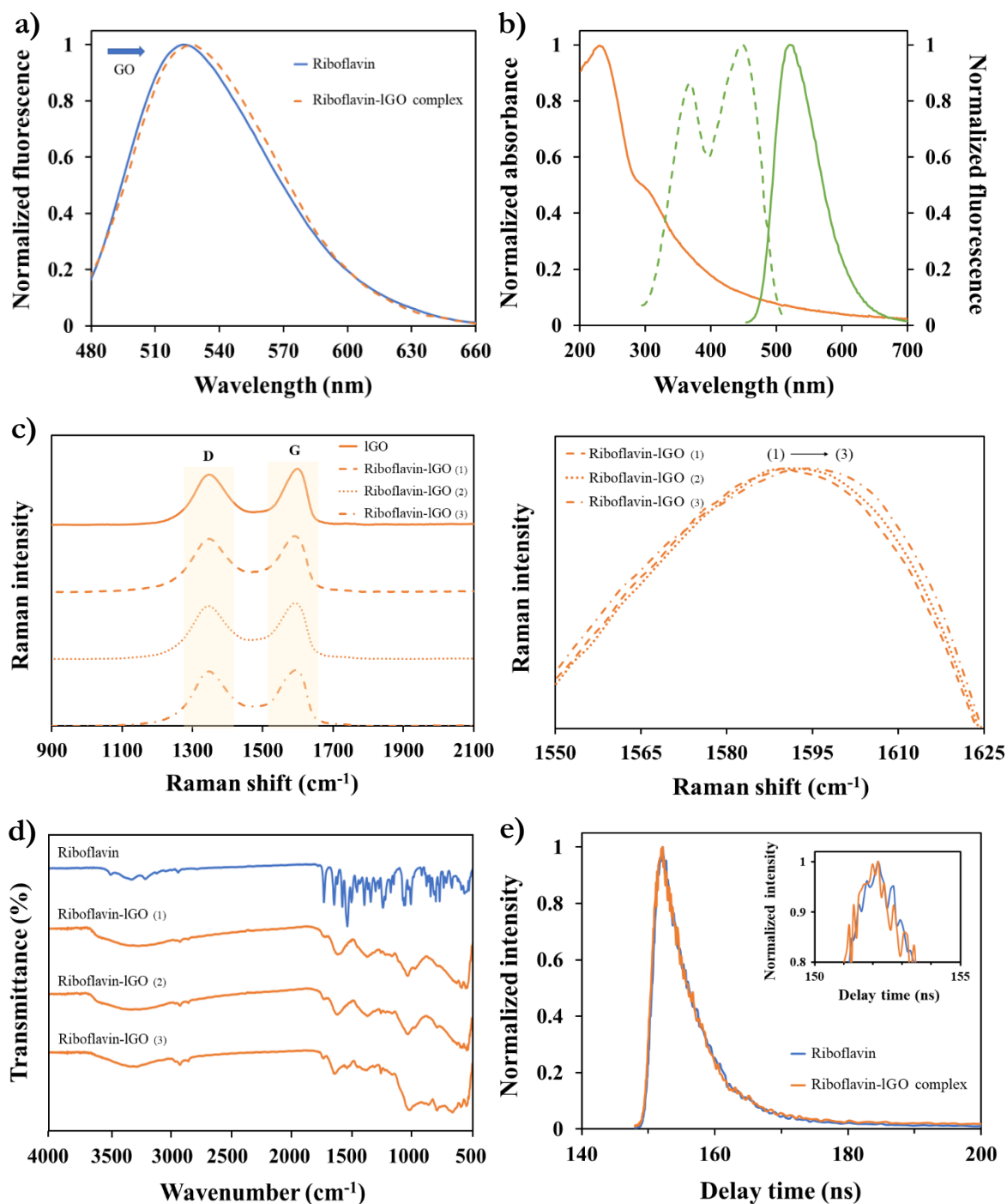


Figure IV.2.9. Characterization of riboflavin-IGO nanoplateform. (a) Red-shift of riboflavin emission profile in the presence of $126.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ IGO (complex formation). (b) Absorption spectrum of IGO (orange line) and fluorescence curves of riboflavin (excitation, green dotted line, and emission, green solid line). (c) Raman profiles of freeze-dried IGO and riboflavin-IGO complexes (1 – 3) from top to bottom (left). Extended spectrum area at the G-band position (right). (d) FT-IR profiles of the complexes. (e) Time-resolved fluorescence decays of riboflavin and riboflavin-IGO complex in a scanning range of 200 ns, under excitation at 368 nm and emission at 524 nm.

IV.2.3.5. Analytical performance characteristics

Several analytical performance characteristics were evaluated to examine the possible applicability of the proposed analytical procedure for both GO and catechin detection.

As previously mentioned, the fluorescence extinction of riboflavin as dye indicator with increasing concentrations of the different GO structures can be used for quantitative determination of GO. **Figure IV.2.10a** shows a clear linear relationship between the riboflavin fluorescence ratio in the absence (I_0) and presence (I) of lGO concentrations from 0.6 to 35.4 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Stern-Volmer plot of this phenomenon resulted to be $I_0/I = 0.843 + 0.026 \cdot [\text{lGO}]$ ($\mu\text{g mL}^{-1}$) with a determination coefficient of 0.996. For sGO and mlGO, a good linear dependence was also found when plotting the analytical signal (I_0/I) and the GO concentration as it is shown in **Figures IV.2.10b** and **IV.2.10c**. The precision of the proposed method for GO determination was evaluated in terms of repeatability and reproducibility expressed as relative standard deviation (RSD), both as function of concentration and (I_0/I) signal. For determining the repeatability, ten independent measurements of lGO standard solutions were carried out consecutively at 14 $\mu\text{g mL}^{-1}$. RSD values (*intra*-day conditions, $n = 10$) were 5.2% as function of concentration and 1.6% as function of I_0/I signal. For reproducibility test (*inter*-day conditions, $n = 5$), RSD values of 6.7% and 2.1% were found for lGO as function of concentration and I_0/I signal, respectively. The sensitivity of the proposed analytical procedure was assessed in terms of limit of detection (LOD) and quantification (LOQ). The LOD value found for lGO was 0.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$, which was experimentally calculated. **Table IV.2.2** also summarizes the details of the analytical figures of merits for the determination of sGO and mlGO materials. According to the slopes of each of the linear fits (K_{SV}), the higher affinity of riboflavin for lGO (0.026 $\text{mL } \mu\text{g}^{-1}$) than for sGO (0.023 $\text{mL } \mu\text{g}^{-1}$) and for mlGO (0.018 $\text{mL } \mu\text{g}^{-1}$) is noteworthy, confirming all the above. The quenching magnitude (the slope of the fitting curves) is higher than those previously reported for similar species involved in this effect.⁵²

To further evaluate the performance of the riboflavin-lGO probe system for catechin detection, the fluorescence signal of free riboflavin (displaced from the

complex) was investigated at different catechin concentrations under the optimized conditions. As shown in **Figure IV.2.10d**, the probe system gradually begins to fluoresce again as the catechin concentration increased. In the wide range of catechin concentrations evaluated ($0.2 - 125.1 \mu\text{g mL}^{-1}$), a first linear range with a steeper slope that comprised concentrations between 1.0 and $20.8 \mu\text{g mL}^{-1}$ and a coefficient of determination of 0.998 was found. The fluorescence recovery efficiency of riboflavin in the presence and absence of catechin (I/I_0) against the target analyte concentrations is represented in **Figure IV.2.10d inset**. Meanwhile, for concentrations that exceeded $20.8 \mu\text{g mL}^{-1}$ and up to $108.3 \mu\text{g mL}^{-1}$, a second linear response with a lower slope was observed with a value of 0.993 as determination coefficient. Being a stronger competitor, initially at lower catechin concentrations it should be easier for riboflavin to be released from the complex, hence the difference in slopes. Concentrations higher than $108.3 \mu\text{g mL}^{-1}$ did not produce further fluorescence recovery. As is recommended to work in the first linear range of concentrations, the quantification of the samples was carried out in this region. The regression equation of the first linear fit was $I/I_0 = 1.384 + 0.172 \cdot [\text{catechin}] (\mu\text{g mL}^{-1})$. The sensing platform begins to recognize catechin at $0.2 \mu\text{g mL}^{-1}$, therefore this value was considered as the experimentally calculated LOD. Concentrations between 0.2 and $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ were perfectly detected but not quantifiable. In this case, the repeatability (*intra-day* conditions) was evaluated through fifteen analyses of $14 \mu\text{g mL}^{-1}$ standard solution and an RSD value of 3.1% in concentration terms was found. Reproducibility (*inter-day* conditions) was evaluated by quintuplicate at the same catechin concentration, obtaining an RSD value of 5.8% . These results suggest that the fluorescence probe system can be easily applied for the quantitative determination of catechin and with good sensitivity.

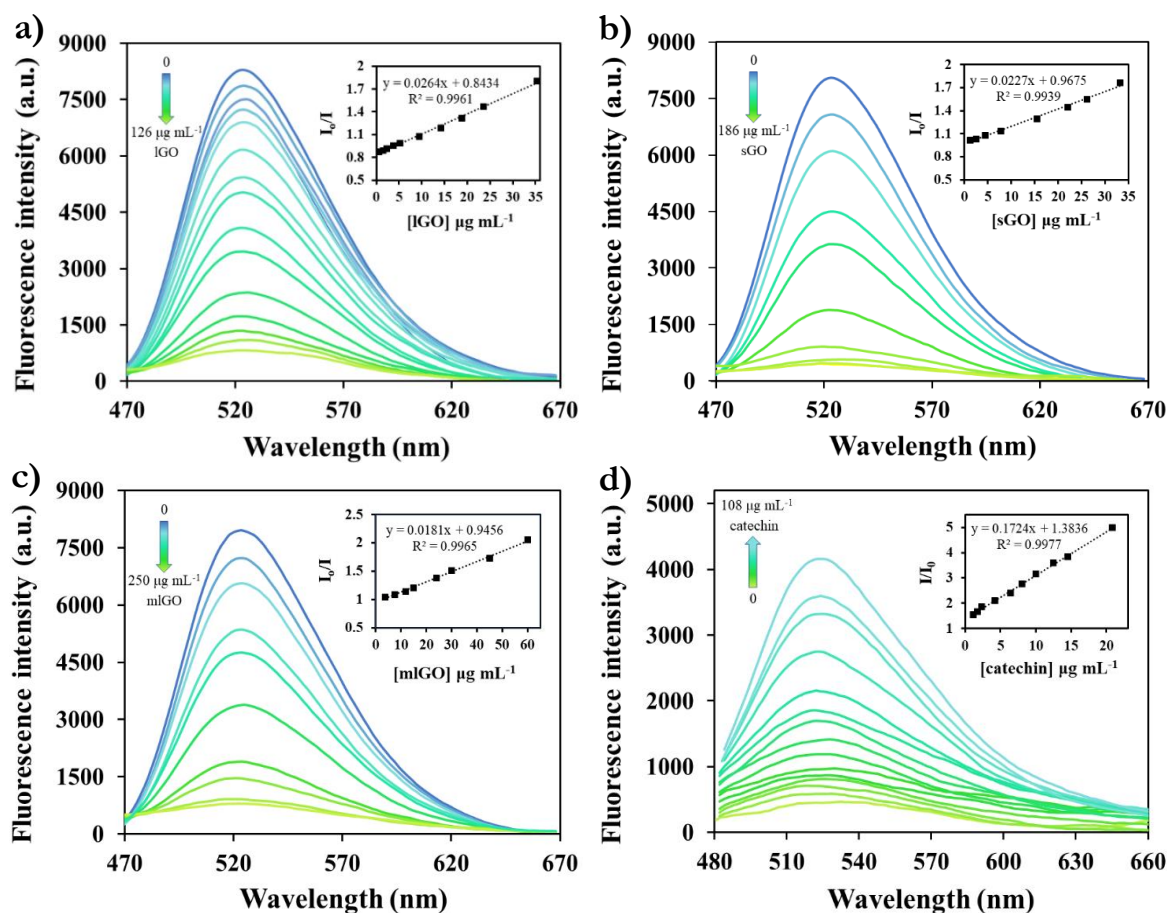


Figure IV.2.10. Calibration curves of (a) IGO, (b) sGO and (c) mlGO. The concentration of riboflavin was $0.38 \mu\text{g mL}^{-1}$, pH 7.5, 15 mmol L^{-1} MES. The insets show the plots of the fluorescence extinction efficiency (I_0/I , $\lambda_{\text{exc}} = 368 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 524 \text{ nm}$) against the concentration each of the GOs. (d) Calibration curve of catechin. The concentration of riboflavin was $0.38 \mu\text{g mL}^{-1}$, $126.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ IGO, pH 6.5, 15 mmol L^{-1} MES. The inset shows the fluorescence recovery efficiency (I/I_0 , $\lambda_{\text{exc}} = 445 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 524 \text{ nm}$) plotted against the catechin concentration.

The details corresponding to the analytical figures of merits for both sensing systems are summarized in **Table IV.2.2**. It should be noted that the proposed sensing systems, both for the detection of GO and catechin, have attractive qualities such as their sensitivity, the simplicity of the analysis in a very short time and are relatively environmentally friendly sensors (employing a vitamin as sensor probe). This analysis strategy allows simultaneous detection and offers a new approach to sensing other compounds of the same nature.

Table IV.2.2. Analytical figures of merits of the proposed methodology for the quantification of GO materials and catechin.

Analyte	Regression equation	Linear range ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	R^2	$S_{y/x}$	RSD% <i>intra</i> -day ^(a)		RSD% <i>inter</i> -day ^(b)	
						Concentration	I_0/I	Concentration	I_0/I
lGO	$I_0/I = (0.843 \pm 0.009) + (0.026 \pm 0.001) \cdot [\text{lGO}]$	0.6 – 35.4	0.2	0.996	0.020	5.2	1.6	6.7	2.1
sGO	$I_0/I = (0.967 \pm 0.013) + (0.023 \pm 0.001) \cdot [\text{sGO}]$	1.2 – 33.2	0.4	0.994	0.023	6.5	1.5	8.4	1.9
mlGO	$I_0/I = (0.946 \pm 0.013) + (0.018 \pm 0.001) \cdot [\text{mlGO}]$	3.8 – 60.1	1.3	0.997	0.023	5.6	1.9	8.8	2.5
catechin	$I/I_0 = (1.384 \pm 0.030) + (0.172 \pm 0.003) \cdot [\text{CAT}]$	1.0 – 20.8	0.2	0.998	0.056	3.1	1.2	5.8	2.3

^(a) Measurements under *intra*-day conditions with $n = 10$ for GO materials and $n = 15$ for (+)-catechin. To evaluate the RSD of the method, $14 \mu\text{g mL}^{-1}$ were used in the case of lGO and sGO; $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ for mlGO and $14 \mu\text{g mL}^{-1}$ for (+)-catechin.

^(b) Measurements under *inter*-day conditions with $n = 5$ both for GO materials and (+)-catechin.

IV.2.3.6. Interference study

To assess the validity and test the selectivity of both GO and catechin sensors, several potential interfering substances were added into the sensing systems in the presence of the analyte under optimal conditions. On the one hand, **Figure IV.2.11a** displays the interference study for detecting GO by monitoring the riboflavin fluorescence response in the presence of the nanomaterial with other commonly coexisting compounds. The concentration of all substances tested was 3-folds of IGO while that of paraquat was the same, specifically $15 \mu\text{g mL}^{-1}$. The results revealed that no evident changes in the fluorescence intensity ratio I_0/I of the probing system in the presence of other compounds tested, including HgCl_2 , NH_4NO_3 , Na_2HPO_4 and K_2CO_3 . Meanwhile, paraquat as an herbicide probably present in environmental samples, would interfere in the detection of GO by ca. 10%. Therefore, a sample treatment should be performed, or a separation technique should be used when the proposed method is applied. In conclusion, the obtained results suggest that the proposed strategy for the determination of GO shows good selectivity.

On the other hand, the selectivity of riboflavin-IGO probe towards catechin in relation to other coexisting species in food products was also evaluated. **Figure IV.2.11b** shows the specificity of the established sensing system to other substances at a catechin concentration $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. As can be observed, the enhanced fluorescence signal (I/I_0) of the probing system was unaffected at 5-fold concentration of the amino acids checked (a representative example of each of them according to their R-side chain: i) R-side chain with additional amino group (*L*-lysine), ii) thiol group (*L*-cysteine), iii) additional carboxylic functional group (*L*-glutamic acid) and iv) carbon chain either aromatic or aliphatic (*L*-alanine)), food additives (citric acid and malic acid) and salts (NaCl and MgSO_4) and 3-fold concentration of the typical sweeteners (glucose, fructose and sucrose). As is common in food samples, some vitamins (ascorbic acid and folic acid) were tested as possible interferents at the same concentration level as catechin. The results revealed that while the presence of ascorbic acid (vitamin C) did not produce any change in the analytical signal, folic acid (vitamin B₉) showed interferences of ca. 22%. However, this enhanced of the analytical signal by the presence of folic acid is due to additivity between the

fluorescent signals since this compound presents an emission band in the wavelength range studied.

Otherwise, catechin molecule presents two chiral centers in its structure, one is on carbon 2 and the other on 3. Therefore, catechin has four diastereomers. Two are isomers of the *trans*-configuration and are called catechin and the other two are of the *cis*-configuration and are called epicatechin. As an example, the addition of the most common isomer of epicatechin, (-)-epicatechin, was evaluated. After all, this is an enantiomer of (+)-catechin and, as expected, it produces a significant increase of about 36% over the analytical signal of the control. Therefore, these 4 species could be simultaneous detected, in fact many compounds present mixtures of enantiomers and the proportion of each of them is not well-known. In view of this results, riboflavin-IIGO system suggested to be selective for catechin determination even in coexistence with high concentrations of the tested substances.

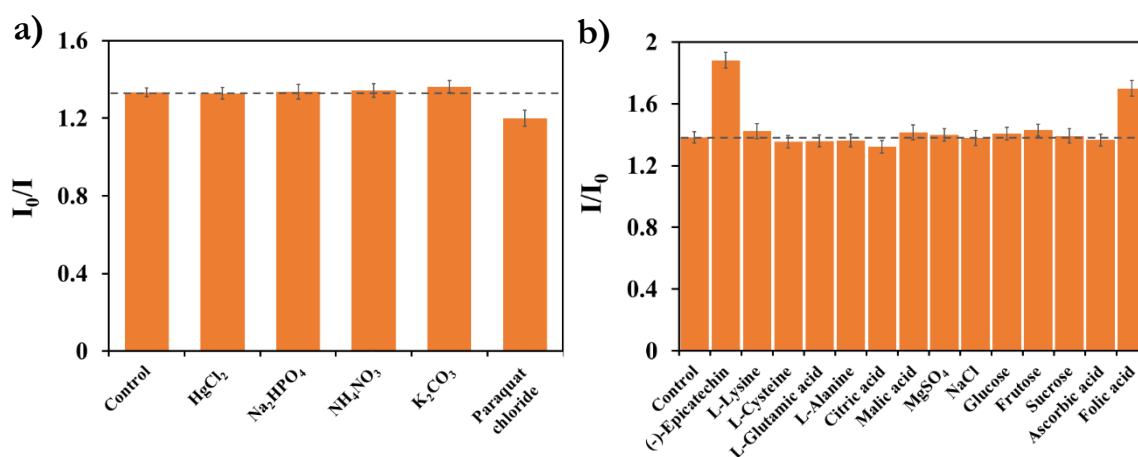


Figure IV.2.11. (a) Selectivity of the established probing system to IGO (control) and IGO with other coexistence substances present in environmental matrices. The concentration of IGO was $15 \mu\text{g mL}^{-1}$ and the solutions were prepared in MES buffer at pH 7.5. (b) Fluorescence response of the riboflavin-GO system to catechin (control) and catechin in the presence of potential interfering compounds from food products. The concentration of catechin was $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. The solutions were prepared in MES buffer at pH 6.5.

IV.2.3.7. Analytical applications

Although there are more and more analytical techniques and methods available for the detection, characterization and quantification of nanomaterials, although they are still scarce, their application to complex samples is still very limited and they are far from being incorporated into routine analysis.

The usefulness of the developed sensing strategy for GO analysis was proved by its application to different environmental samples (waters from different nature and a soil) and in the case of catechin, food samples (cocoa beans and beverages) were used. Each sample was treated according to the procedure already described in section “*Samples treatment*” and subsequently submitted to the analytical procedure detailed in section “*Fluorescence spectra analysis and analytical procedure*”. All samples were analysed in triplicate by the proposed fluorometric assay.

The different water samples were fortified at four concentration levels of lGO between 1.1 and 4.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and the soil sample was also doped with the nanomaterial in the range 23.8 – 88.2 $\mu\text{g g}^{-1}$. Previously, all the matrices were checked not showing interference in the analytical signal. The concentration of lGO in each sample was estimated by external calibration and the obtained results are summarized in **Table IV.2.3a**. As can be observed, satisfactory results were obtained for all of them with recovery values of the added GO between 96 and 103% and from 97 to 99% for water and soil samples, respectively. Furthermore, RSD values ($n = 3$) were lower than 4% for all environmental samples evaluated. The fluorescence turn-off effect produced by lGO in environmental matrices can be observed in **Figure IV.2.12**.

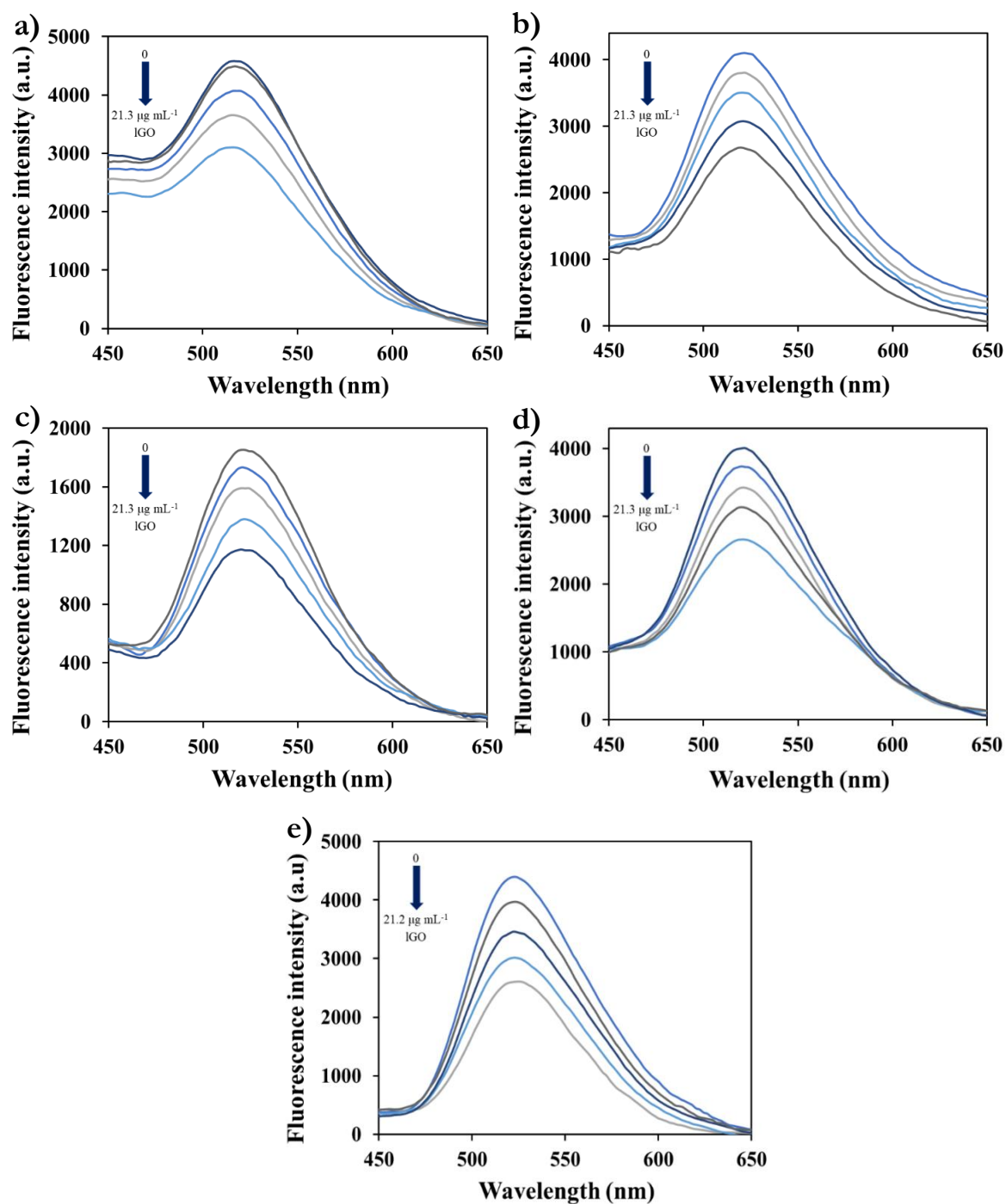


Figure IV.2.12. Analyses of (a) river water, (b) drinking water, (c) seawater and (d) well water samples fortified at different concentration levels of IGO between 1.1 and 4.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, and (e) soil samples fortified between 23.8 and 88.2 $\mu\text{g g}^{-1}$ of IGO. The concentration of riboflavin was 0.38 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 15 mmol L^{-1} MES, pH 7.5, 3 min interaction time, λ_{exc} 368 nm and λ_{em} 524 nm.

On the other hand, the determination of catechin in liquid food samples was carried out by adding the target analyte to a green tea and a red wine sample in the concentration range 10.0 – 36.6 $\mu\text{g mL}^{-1}$. In this case and for both types of samples,

an alteration in the analytical signal was observed by the corresponding matrix. As can be observed in **Table IV.2.3b**, the recovery values obtained were quite favorable for both types of samples, especially for those with lower concentrations of catechin. At higher concentrations of this analyte in the sample, the catechin concentrations found are increasingly lower than the added ones. This may be since other compounds present in the matrix have a slight affinity to the riboflavin-GO complex and can be adsorbed, competing with catechin molecules (possible interferers). Even so, recovery values between 95 and 99% were found for red wine samples and for green tea ones were between 94 and 102% with low RSD values ($\leq 4\%$) for all of them. **Figure IV.2.13** shows the turn-on effect produced in the red wine and green tea samples.

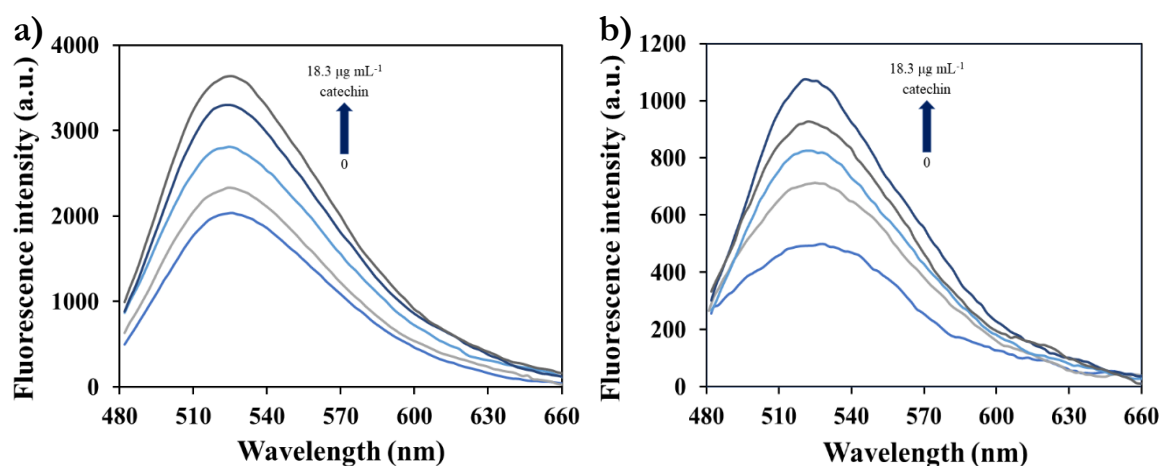


Figure IV.2.13. Detection of catechin in (a) red wine and (b) green tea matrices doped with different concentrations from 10.0 and 36.6 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The concentration on riboflavin was 0.38 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 126 $\mu\text{g mL}^{-1}$ IGO, 15 mmol L⁻¹ MES, pH 6.5, 1 min interaction time, λ_{exc} 445 nm and λ_{em} 524 nm.

Table IV.2.3. Recoveries obtained (a) in environmental enriched samples with IGO and (b) in food matrices enriched with catechin.

(a) Determination of IGO					
Type of sample	Sample	Spiked concentration	Found concentration ^(a)	Recovery ($n = 3$, %)	RSD ($n = 3$, %)
River water ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1	1.05	1.02 ± 0.03	97.1 ± 2.9	3.0
	2	1.89	1.82 ± 0.05	96.0 ± 2.7	2.8
	3	2.94	2.92 ± 0.09	99.2 ± 3.0	3.0
	4	3.99	4.01 ± 0.12	100.5 ± 2.9	3.1
Well water ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1	1.05	1.05 ± 0.03	99.8 ± 3.2	3.2
	2	1.89	1.82 ± 0.06	96.2 ± 3.0	3.1
	3	2.94	2.85 ± 0.08	97.1 ± 2.7	2.8
	4	3.99	3.86 ± 0.13	96.8 ± 3.2	3.3
Drinking water ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1	1.05	1.07 ± 0.03	101.8 ± 2.8	2.7
	2	1.89	1.84 ± 0.05	97.3 ± 2.5	2.5
	3	2.94	2.91 ± 0.08	99.1 ± 2.7	2.7
	4	3.99	3.93 ± 0.11	98.5 ± 2.8	2.9
Seawater ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1	1.05	1.04 ± 0.03	98.8 ± 3.1	3.2
	2	1.89	1.84 ± 0.05	97.1 ± 2.5	2.6
	3	2.94	3.02 ± 0.08	102.6 ± 2.8	2.7
	4	3.99	4.00 ± 0.12	100.2 ± 3.1	3.1
Soil ($\mu\text{g g}^{-1}$)	1	23.80	23.54 ± 0.73	98.9 ± 3.0	3.1
	2	40.25	39.97 ± 1.01	98.4 ± 2.5	2.5
	3	64.40	62.65 ± 2.29	97.3 ± 3.6	3.7
	4	88.20	86.17 ± 2.68	97.7 ± 3.0	3.1
(b) Determination of (+)-catechin					
Type of sample	Sample	Spiked concentration	Found concentration ^(a)	Recovery ($n = 3$, %)	RSD ($n = 3$, %)
Red wine ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1	10.00	9.92 ± 0.32	99.2 ± 3.2	3.2
	2	18.32	18.15 ± 0.55	99.1 ± 3.0	3.0
	3	25.00	24.48 ± 0.68	97.9 ± 2.7	2.8
	4	36.60	34.97 ± 1.05	95.6 ± 2.9	3.0
Green tea ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1	10.00	10.19 ± 0.34	101.9 ± 3.4	3.3
	2	18.32	18.25 ± 0.51	99.6 ± 2.8	2.8
	3	25.00	23.76 ± 0.77	95.0 ± 3.1	3.2
	4	36.60	34.47 ± 1.28	94.2 ± 3.5	3.7

^(a) Average of 3 independent spiked samples \pm standard deviation.

The determination of catechin was also performed in a cocoa beans sample, which endogenously contains the analyte. Moreover, cocoa beans sample was spiked with 30.2 and 69.7 $\mu\text{g g}^{-1}$ of catechin. Recovery values were around 98% as summarized in **Table IV.2.4**, which ensures the accuracy of the proposed method. **Figure IV.2.14** presents the results found for the determination of catechin in the cocoa matrix by the proposed procedure.

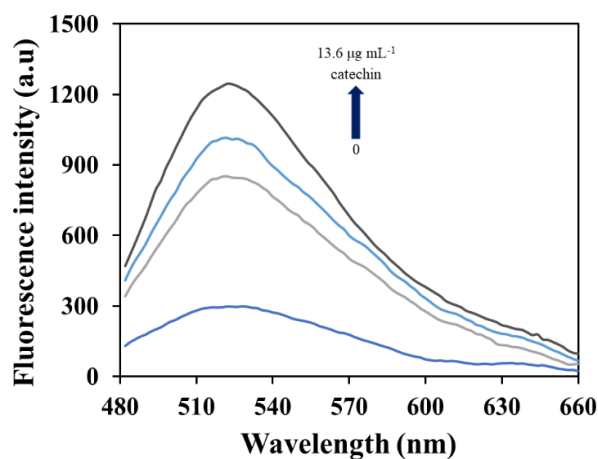


Figure IV.2.14. Detection of catechin in a cocoa sample endogenously containing the analyte and after adding 3.0 and 7.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The concentration on riboflavin was 0.38 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 126 $\mu\text{g mL}^{-1}$ IGO, 15 mmol L^{-1} MES, pH 6.5, 1 min interaction time, λ_{exc} 445 nm and λ_{em} 524 nm.

As a further validation study and with the aim to prove the reliability of the proposed catechin sensor, the cocoa sample was also submitted to a previously validated electrophoretic method,²⁷ slightly modified, to estimate the flavonoid concentration. The analyses were performed by five-fold. The experimental conditions of the modified electrophoretic method appear in section “*Quantification of catechin by capillary electrophoresis*”.

Table IV.2.4 summarizes the obtained concentration values of catechin in cocoa sample by the proposed fluorometric procedure and the CE method. Once the cocoa results were obtained, Student-*t* test was performed between these two sets of data to verify the statistical accordance between the results found by both methodologies.⁵³ The values for t_{exp} and t_{crit} were 1.0 and 2.8, respectively. As the value of t_{exp} is lower than that of t_{crit} , the absence of significant differences between the results obtained by both methodologies can be guaranteed, which would prove its comparative accuracy at the checked level of confidence (95%). These results

demonstrated the potential applicability of the probing system for the detection of catechin in cocoa samples. The difference between the analysis time required for each of the procedures should be highlighted, being much lower, of the order of 10 times, for the fluorometric sensor.

Table IV.2.4. Determination of catechin in cocoa beans using the proposed fluorescence methodology and CE-DAD method. Recoveries obtained in cocoa beans enriched sample.

Sample	Original amount		Spiked concentration ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Found concentration ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Recovery ($n = 3$, %)	RSD ($n = 3$, %)
	CE-DAD ($n = 5$)	This method ($n = 5$)				
Cocoa beans	92.4 ± 4.3	103.5 ± 3.3	30.24	131.37 ± 4.20	98.3 ± 3.1	3.2
			69.72	170.07 ± 5.96	98.2 ± 3.4	3.5

IV.2.4. Conclusions

Competitive adsorption–desorption behaviour of a popular fluorescent vitamin and a flavonoid compound, riboflavin and catechin, on a chemically heterogeneous GO surface is discussed in this study. Thus, a novel and label-free turn-off-on fluorescent approach for the detection of both, GO and catechin, based on the riboflavin-GO and catechin-GO complexes formation was developed. Although they are not enough, there are more and more analytical techniques and methods available for the detection, characterization and quantification of nanomaterials, however their application to complex samples is still very limited and it is far from being incorporated into routine analysis.

Herein, riboflavin emission was gradually turned-off as the fluorophore interacted with GO nanolayers by π - π stacking interactions. The strongest interaction was produced between the dye and lGO, followed by sGO and lastly with mlGO. Therefore, the former was selected based on the least amount of nanomaterial needed for the complex production and highest quenching effect. In this sense, it has been established that the lateral size and mainly the thickness of these carbon-based nanostructures are very important physicochemical parameters for the good performance of this type of novel sensors. This effect occurred for the three GO types evaluated, allowing the quantitative analysis of this type of nanomaterial.

Detection limits of GO structures were 0.2, 0.4 and 1.3 $\mu\text{g mL}^{-1}$, for lGO, sGO and mlGO, respectively. In turn, once the riboflavin-GO complex was formed at the maximum fluorescence extinction, that is, since most of the riboflavin molecules are attached, the presence of catechin (as stronger competitor) was capable to replace riboflavin (as weaker competitor) from the complex, switching-on the fluorescence signal due to the competitive adsorption between catechin and riboflavin for the GO surface. Catechin quantification range was wide from 1.0 to 20.8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and the limit of detection resulted to be 0.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Compared to traditional instrumentation (HPLC, GC, or CE) for catechin analysis, the advantage of this developed procedure was based on short analysis times, economy, easy to operate, no tedious sample pre-treatment required, and to be an eco-friendly strategy. This dual determination contributes to the first (GO as analyte) and second (GO as nanotool) way of Analytical Nanoscience and Nanotechnology.

Furthermore, the detection platform is a potential assay principle for the detection of other interesting organic molecules and biomolecules due to the different adsorption capacity of multiple fluorophores and analytes with different molecular structures.

Acknowledgements

The Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO) and Regional Government of Castilla-La Mancha (JCCM) are gratefully acknowledged for funding this investigation with Grants PID2019-104381GB-I00 and SBPLY/17/180501/000262, respectively. Esther Pinilla-Peñalver also acknowledges MINECO for the predoctoral contract BES-2017-080357.

References

1. Ren, H.; Kulkarni, D. D.; Kodiyath, R.; Xu, W.; Choi, I.; Tsukruk, V. V. Competitive adsorption of dopamine and rhodamine 6G on the surface of graphene oxide. *ACS Applied Materials and Interfaces* **2014**, *6*(4), 2459-2470.
2. Zheng, P.; Wu, N. Fluorescence and sensing applications of graphene oxide and graphene quantum dots: a Review. *Chemistry—An Asian Journal* **2017**, *12*(18), 2343-2353.
3. Goodwin Jr, D. G.; Adeleye, A. S.; Sung, L.; Ho, K. T.; Burgess, R. M.; Petersen, E. J. Detection and quantification of graphene-family nanomaterials in the environment. *Environmental Science and Technology* **2018**, *52*(8), 4491-4513.
4. Esteban-Arranz, A.; Pérez-Cadenas, M.; Muñoz-Andrés, V.; Guerrero-Ruiz, A. Evaluation of graphenic and graphitic materials on the adsorption of Triton X-100 from aqueous solution. *Environmental Pollution* **2021**, *284*, 117161.
5. Esteban-Arranz, A.; Compte-Tordesillas, D.; Muñoz-Andrés, V.; Pérez-Cadenas, M.; Guerrero-Ruiz, A. Effect of surface, structural and textural properties of graphenic materials over cooperative and synergetic adsorptions of two chloroaromatic compounds from aqueous solution. *Catalysis Today* **2018**, *301*, 104-111.
6. Seraj, S.; Rouhani, S. Fluorescence Quenching as an Efficient Tool for Sensing Application: Study on the Fluorescence Quenching of Naphthalimide Dye by Graphene Oxide. *International Journal of Chemical and Molecular Engineering* **2018**, *11*(12), 851-854.
7. Bozkurt, E.; Acar, M.; Onganer, Y.; Meral, K. Rhodamine 101–graphene oxide composites in aqueous solution: the fluorescence quenching process of rhodamine 101. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2014**, *16*(34), 18276-18281.
8. Huang, S. T.; Shi, Y.; Li, N. B.; Luo, H. Q. Sensitive turn-on fluorescent detection of tartrazine based on fluorescence resonance energy transfer. *Chemical Communications* **2012**, *48*(5), 747-749.

9. Li, C. P.; Tan, S.; Ye, H.; Cao, J.; Zhao, H. A novel fluorescence assay for resveratrol determination in red wine based on competitive host-guest recognition. *Food Chemistry* **2019**, *283*, 191-198.
10. Martín-Folgar, R.; Esteban-Arranz, A.; Negri, V.; Morales, M. Toxicological effects of three different types of highly pure graphene oxide in the midge *Chironomus riparius*. *Science of The Total Environment* **2022**, *815*, 152465.
11. Benítez-Martínez, S.; López-Lorente, A. I.; Valcárcel, M. Graphene quantum dots sensor for the determination of graphene oxide in environmental water samples. *Analytical Chemistry* **2014**, *86*(24), 12279-12284.
12. Monikh, F. A.; Chupani, L.; Vijver, M. G.; Vancová, M.; Peijnenburg, W. J. Analytical approaches for characterizing and quantifying engineered nanoparticles in biological matrices from an (eco) toxicological perspective: old challenges, new methods and techniques. *Science of The Total Environment* **2019**, *660*, 1283-1293.
13. Pinilla-Peñalver, E.; Villaseñor, M. J.; Contento, A. M.; Ríos, Á. Erythrosine B-coated gold nanoparticles as an analytical sensing tool for the proper determination of both compounds based on surface-enhanced Raman spectroscopy. *Microchemical Journal* **2020**, *157*, 104937-104948.
14. Suárez-Oubiña, C.; Herbello-Hermelo, P.; Bermejo-Barrera, P.; Moreda-Piñeiro, A. Single-particle inductively coupled plasma mass spectrometry using ammonia reaction gas as a reliable and free-interference determination of metallic nanoparticles. *Talanta* **2022**, *242*, 123286-123295.
15. Yang, S.; Chen, Q.; Shi, M.; Zhang, Q.; Lan, S.; Maimaiti, T.; Li, Q.; Ouyang, P.; Tang, K.; Yang, S. T. Fast identification and quantification of graphene oxide in aqueous environment by Raman spectroscopy. *Nanomaterials* **2020**, *10*(4), 770-780.
16. Cayuela, A.; Soriano, M. L.; Valcárcel, M. β -Cyclodextrin functionalized carbon quantum dots as sensors for determination of water-soluble C 60 fullerenes in water. *Analyst* **2016**, *141*(9), 2682-2687.
17. Pinilla-Peñalver, E.; Soriano, M. L.; Durán, G. M.; Llorent-Martínez, E. J.; Contento, A. M.; Ríos, Á. Discrimination between nanocurcumin and free curcumin

using graphene quantum dots as a selective fluorescence probe. *Microchimica Acta* **2020**, *187*(8), 1-11.

18. Montes, C.; Soriano, M. L.; Villaseñor, M. J.; Ríos, Á. Design of a 3D interfacial sensors liquid sensing platform based on Au-nanobones for discrimination and quantitation of quercetin loaded nanoemulsions. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2022**, 131509-131519.

19. Maheshwari, N.; Mahmood, R. Protective effect of catechin on pentachlorophenol-induced cytotoxicity and genotoxicity in isolated human blood cells. *Environmental Science and Pollution Research* **2020**, *27*(12), 1-18.

20. Mechchate, H.; Es-Safi, I.; Haddad, H.; Bekkari, H.; Grafov, A.; Bousta, D. Combination of Catechin, Epicatechin, and Rutin: optimization of a novel complete antidiabetic formulation using a mixture design approach. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **2021**, *88*, 108520-108537.

21. Dutta, S.; Priyadarshini, S.; Moses, J. A.; Anandharamakrishnan, C. Supercritical Fluid and Ultrasound-assisted Green Extraction Technologies for Catechin Recovery. *ChemBioEng Reviews* **2021**, *8*(6), 654-664.

22. Du, C.; Ma, C.; Gu, J.; Li, L.; Zhu, C.; Chen, L.; Wang, T.; Chen, G. Rapid Determination of Catechin Content in Black Tea by Fluorescence Spectroscopy. *Journal of Spectroscopy* **2020**, *2020*, 1-8.

23. Larrauri, A.; Núñez, O.; Hernández-Cassou, S.; Saurina, J. Determination of polyphenols in white wines by liquid chromatography: Application to the characterization of alella (Catalonia, Spain) wines using chemometric methods. *Journal of AOAC International* **2017**, *100*(2), 323-329.

24. de Souza Dias, F.; Silva, M. F.; David, J. M. Determination of quercetin, gallic acid, resveratrol, catechin and malvidin in Brazilian wines elaborated in the vale do são francisco using liquid-liquid extraction assisted by ultrasound and GC-MS. *Food Analytical Methods* **2013**, *6*(3), 963-968.

25. Piovezan, M.; García-Seco, D.; Micke, G. A.; Gutiérrez-Mañero, J.; Ramos-Solano, B. Method development for determination of (+)-catechin and

- (-)-epicatechin by micellar electrokinetic chromatography: Annual characterization of field grown blackberries. *Electrophoresis* **2013**, *34*(15), 2251-2258.
26. Gottumukkala, R. V.; Nadimpalli, N.; Sukala, K.; Subbaraju, G. V. Determination of Catechin and Epicatechin content in chocolates by high-performance liquid chromatography. *International Scholarly Research Notices* **2014**, *2014*, 1-5.
27. Pinilla-Peñalver, E.; Soriano, M. L.; Contento, A. M.; Ríos, Á. Cyclodextrin-modified graphene quantum dots as a novel additive for the selective separation of bioactive compounds by capillary electrophoresis. *Microchimica Acta* **2021**, *188*(12), 1-12.
28. Jasim, D. A.; Lozano, N.; Kostarelos, K. Synthesis of few-layered, high-purity graphene oxide sheets from different graphite sources for biology. *2D Materials* **2016**, *3*(1), 14006-14022.
29. Rodrigues, A. F.; Newman, L.; Lozano, N.; Mukherjee, S. P.; Fadeel, B.; Bussy, C.; Kostarelos, K. A blueprint for the synthesis and characterisation of thin graphene oxide with controlled lateral dimensions for biomedicine. *2D Materials* **2018**, *5*(3), 035020.
30. Arranz, A. E.; Arranz, M. Á.; Morales, M.; Martín-Folgar, R.; Álvarez-Rodríguez, J. Thickness of graphene oxide-based materials as a control parameter. **2021**.
31. Dresselhaus, M.; Jorio, A.; Souza Filho, A.; Saito, R. Defect characterization in graphene and carbon nanotubes using Raman spectroscopy. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* **2010**, *368*(1932), 5355-5377.
32. López-Díaz, D.; Lopez Holgado, M.; García-Fierro, J. L.; Velázquez, M. M. Evolution of the Raman spectrum with the chemical composition of graphene oxide. *The Journal of Physical Chemistry C* **2017**, *121*(37), 20489-20497.
33. Țucureanu, V.; Matei, A.; Avram, A. M. FTIR spectroscopy for carbon family study. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **2016**, *46*(6), 502-520.

34. Fuente, E.; Menéndez, J.; Díez, M.; Suárez, D.; Montes-Morán, M. Infrared spectroscopy of carbon materials: a quantum chemical study of model compounds. *The Journal of Physical Chemistry B* **2003**, *107*(26), 6350-6359.
35. Chang, D. W.; Lee, E. K.; Park, E. Y.; Yu, H.; Choi, H. J.; Jeon, I. Y.; Sohn, G. J.; Shin, D.; Park, N.; Oh, J. H. Nitrogen-doped graphene nanoplatelets from simple solution edge-functionalization for n-type field-effect transistors. *Journal of the American Chemical Society* **2013**, *135*(24), 8981-8988.
36. Liu, F. F.; Zhao, J.; Wang, S.; Du, P.; Xing, B. Effects of solution chemistry on adsorption of selected pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) by graphenes and carbon nanotubes. *Environmental Science and Technology* **2014**, *48*(22), 13197-13206.
37. Kumar, P. V.; Bardhan, N. M.; Tongay, S.; Wu, J.; Belcher, A. M.; Grossman, J. C. Scalable enhancement of graphene oxide properties by thermally driven phase transformation. *Nature Chemistry* **2014**, *6*(2), 151-158.
38. Srisantitham, S.; Sukwattanasinitt, M.; Unarunotai, S. Effect of pH on fluorescence quenching of organic dyes by graphene oxide. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2018**, *550*, 123-131.
39. Ji, D. K.; Zhang, Y.; He, X.-P.; Chen, G.-R. An insight into graphene oxide associated fluorogenic sensing of glycodye–lectin interactions. *Journal of Materials Chemistry B* **2015**, *3*(32), 6656-6661.
40. Drössler, P.; Holzer, W.; Penzkofer, A.; Hegemann, P. pH dependence of the absorption and emission behaviour of riboflavin in aqueous solution. *Chemical Physics* **2002**, *282*(3), 429-439.
41. Hyde, A. M.; Zultanski, S. L.; Waldman, J. H.; Zhong, Y. L.; Shevlin, M.; Peng, F. General principles and strategies for salting-out informed by the Hofmeister series. *Organic Process Research and Development* **2017**, *21*(9), 1355-1370.
42. Banerjee, R.; Sinha, R.; Purkayastha, P. β -Cyclodextrin encapsulated coumarin 6 on graphene oxide nanosheets: Impact on ground-state electron transfer and excited-state energy transfer. *ACS Omega* **2019**, *4*(14), 16153-16158.

43. Chen, J. L.; Yan, X.-P.; Meng, K.; Wang, S. F. Graphene oxide based photoinduced charge transfer label-free near-infrared fluorescent biosensor for dopamine. *Analytical Chemistry* **2011**, *83*(22), 8787-8793.
44. Liu, Y.; Liu, C. Y.; Liu, Y. Investigation on fluorescence quenching of dyes by graphite oxide and graphene. *Applied Surface Science* **2011**, *257*(13), 5513-5518.
45. Weselucha-Birczyńska, A.; Morajka, K.; Stodolak-Zych, E.; Długoń, E.; Dużyja, M.; Lis, T.; Gubernat, M.; Ziąbka, M.; Błażewicz, M. Raman studies of the interactions of fibrous carbon nanomaterials with albumin. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2018**, *196*, 262-267.
46. Paillet, M.; Parret, R.; Sauvajol, J. L.; Colomban, P. Graphene and related 2D materials: An overview of the Raman studies. *Journal of Raman Spectroscopy* **2018**, *49*(1), 8-12.
47. Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer Science & Business media **2013**.
48. Wang, L.; Liu, R.; Chi, Z.; Yang, B.; Zhang, P.; Wang, M. Spectroscopic investigation on the toxic interactions of Ni²⁺ with bovine hemoglobin. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2010**, *76*(2), 155-160.
49. Makowska, J.; Żamojć, K.; Wyrzykowski, D.; Uber, D.; Wierzbicka, M.; Wiczak, W.; Chmurzyński, L. Binding of Cu (II) ions to peptides studied by fluorescence spectroscopy and isothermal titration calorimetry. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2016**, *153*, 451-456.
50. Lammers, I.; Lhiaubet-Vallet, V.; Ariese, F.; Miranda, M. A.; Gooijer, C. Binding of naproxen enantiomers to human serum albumin studied by fluorescence and room-temperature phosphorescence. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2013**, *105*, 67-73.
51. Zhang, J.; Lu, X.; Lei, Y.; Hou, X.; Wu, P. Exploring the tunable excitation of QDs to maximize the overlap with the absorber for inner filter effect-based phosphorescence sensing of alkaline phosphatase. *Nanoscale* **2017**, *9*(40), 15606-15611.

52. Díez-Pascual, A. M.; García-García, D.; San Andrés, M. P.; Vera, S. Determination of riboflavin based on fluorescence quenching by graphene dispersions in polyethylene glycol. *RSC Advances* **2016**, 6(24), 19686-19699.
53. Miller, J.; Miller, J. C. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, Pearson education **2018**.

V V Capítulo V

**Mejora de las propiedades del
bioactivo resveratrol utilizando
nanomateriales y su control analítico**

En el último capítulo de esta Memoria se aborda el estudio de la capacidad que posee un nanomaterial basado en carbono, utilizado anteriormente para otros estudios, de mantener las propiedades biológicamente activas de un compuesto polifenólico natural, como es el resveratrol. Según señalan algunos estudios, los polifenoles tienen un marcado poder antioxidante en nuestro organismo y al mismo tiempo, acción vasodilatadora, antiinflamatoria, antitrombótica y antiaterogénica. Es por ello, que existe una tendencia creciente al desarrollo de alimentos que al mismo tiempo que nutren también pueden ejercer un efecto terapéutico ante determinadas enfermedades por acción de aditivos. Hasta la actualidad, los antioxidantes sintéticos comestibles más utilizados han sido el hidroxianisol butilado (BHA), el hidroxitolueno butilado (BHT), el galato de propilo y la hidroquinona de terc-butilo. Sin embargo, BHA y BHT han sido restringidos por normas legislativas debido a dudas sobre sus posibles efectos contraproducentes para la salud. Por este motivo, existe un interés creciente en antioxidantes naturales y más seguros para aplicaciones alimentarias por lo que se ha dado impulso en la exploración de fuentes naturales de antioxidantes.

A pesar de las incuestionables ventajas que presentan los polifenoles naturales, su incorporación a gran escala en los alimentos procesados se ve limitada. Esto es debido a serios problemas como son su baja biodisponibilidad debido su carácter hidrófobo y su inestabilidad debido a procesos físicos y químicos de degradación frente a diferentes factores externos como son la luz, las altas temperaturas, el oxígeno y la elevada humedad ambiental.

Con objeto de superar los desafíos anteriormente mencionados, en este capítulo se ha planteado una alternativa que consiste en la protección de resveratrol de su limitada estabilidad frente a la luz, uno de los principales factores de estrés a los que se somete este compuesto durante periodos prolongados de almacenamiento.

Seguidamente se realiza una breve descripción de las principales características fisicoquímicas y potenciales beneficios para la salud del bioactivo seleccionado para el desarrollo experimental del presente capítulo.

Resveratrol

Durante las últimas décadas, la fitoterapia ha llamado la atención de la población debido a sus valiosas propiedades, seguridad y bajos efectos secundarios.¹ El resveratrol es un compuesto bioactivo fenólico natural, no flavonoide, con estructura de estilbeno. Este polifenol es producido por algunas plantas como agente de autodefensa ya que presenta actividad antimicrobiana y antifúngica (fitoalexina).^{2,3} No fue hasta 1940 cuando Takaoka pudo caracterizar su estructura química al lograr aislar este compuesto de las raíces del eléboro blanco (*Veratrum grandiflorum*).⁴ Sin embargo, hacía más de 2.000 años que ya estaba presente en preparados medicinales. Las principales fuentes alimenticias del resveratrol incluyen numerosas plantas y frutos como los arándanos, frambuesas, moras, cacahuets y, sobre todo, la uva tinta. Además, como consecuencia, sus productos derivados como es el vino tinto (concentraciones entre 0,1 y 14,3 mg L⁻¹).^{3,5}

El resveratrol es un sólido cristalino de color blanco, cuya estructura consta de dos anillos fenólicos unidos por un doble enlace estireno formando el 3,5,4'-trihidroxiestilbeno, cuyo peso molecular es de 228,25 g mol⁻¹. Es este doble enlace el responsable de que el resveratrol presente las formas isoméricas *cis* y *trans* (**Figura V.1**). El isómero *trans* es la isoforma predominante y natural más estable desde el punto de vista estérico.⁶

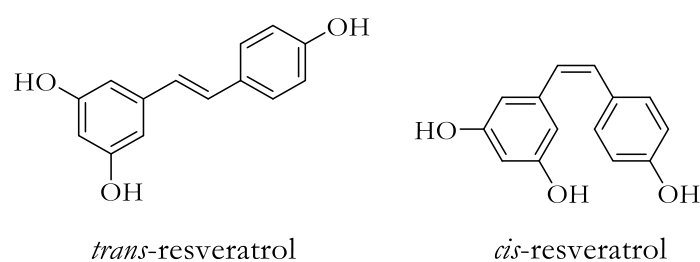


Figura V.1. Estructura química de las moléculas de *trans*-resveratrol y *cis*-resveratrol.

Durante las últimas décadas, el resveratrol ha recibido gran atención por parte de médicos e investigadores por sus efectos beneficiosos para la salud. El número de estudios focalizados en este polifenol se incrementó considerablemente a partir 1997, tras informarse por primera vez sobre el efecto anticancerígeno de esta molécula.⁶

Además, se ha demostrado que el resveratrol exhibe una potencial actividad antioxidante, así como, propiedades antiinflamatorias, neuroprotectoras y antivirales.⁷

Generalmente, los polifenoles son compuestos antioxidantes, es decir, compuestos capaces de proteger los sistemas biológicos frente a reacciones o procesos que puedan producir un efecto potencialmente dañino, como es el caso de las especies reactivas de oxígeno (EROS o ROS) o nitrógeno (ERN o NOS).⁸ Estas especies son agentes oxidantes inestables y muestran una elevada reactividad, causando el degaste de nuestras células. Las células dañadas presentan niveles basales de especies reactivas y un entorno redox alterado en comparación con las células sanas. Así, se perjudica el metabolismo normal del cuerpo humano, acelerando el envejecimiento celular que en muchos casos se manifiesta como una lesión y posteriormente una patología. Los antioxidantes son moléculas capaces de captar el electrón desapareado que presentan los radicales libres desactivándolos, para así evitar daños en biomoléculas cruciales como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos.⁹

La producción de especies reactivas de oxígeno y otros radicales libres es un proceso natural del metabolismo celular;¹⁰ sin embargo, la exposición a contaminantes, presentes en el medioambiente, estilo de vida, y situaciones patológicas, pueden generar un exceso o acumulación de estos. Para evitar el estrés oxidativo, el organismo tiende a equilibrar esta balanza mediante la acción de los antioxidantes. Sin embargo, nuestro organismo genera algunas enzimas antioxidantes que, desgraciadamente, no son suficientes. Por este motivo, el hecho de obtener resultados elevados en antioxidantes no indica necesariamente un resultado positivo, al igual que un resultado bajo en ellos no indica un resultado negativo.

El *trans*-resveratrol es principalmente el isómero biológicamente activo del resveratrol y, por lo tanto, el responsable de los efectos terapéuticos.^{11, 12} Aunque se han demostrado los efectos beneficiosos producidos por el resveratrol, existen dos grandes limitaciones en su actividad biológica, la primera de ellas es su probabilidad de sufrir isomerización transformándose en *cis*-resveratrol, y la segunda de ellas reside en su escasa solubilidad en disoluciones acuosas ($\sim 0.03 \text{ g L}^{-1}$). En relación con la primera de las limitaciones, el resveratrol es una especie fotosensible y la

isomerización a *cis*-resveratrol ocurre cuando el isómero *trans* pierde su estabilidad al exponerse a la luz solar o radiación UV.¹² Por estas razones, los efectos biológicos del polifenol podrían verse reducidos en gran medida.¹¹ Por lo tanto, es de gran importancia proteger el resveratrol de su isomerización conservándolo en su isoforma biológicamente activa.

Además, esta problemática unida a la baja disponibilidad que presenta en el organismo, como consecuencia de su carácter lipofílico, ha fomentado el desarrollo de suplementos nutricionales a base de resveratrol. De hecho, la forma de conservación aconsejada es comúnmente indicada en el prospecto de este tipo de suplementos, aunque a veces no es suficiente. Generalmente, se elaboran suplementos en diferentes dosis, ya sea como sustancia única o juntamente con otros componentes como por ejemplo quercetina, coenzima Q10, vitamina C, entre otros.

Por todo ello, es de especial importancia el consumo moderado de antioxidantes a través de la dieta y evitar los factores de riesgo que inducen reacciones oxidativas en nuestro organismo. Sin embargo, y atendiendo especialmente al resveratrol, no tendría sentido su consumo con el fin de aprovechar sus potenciales propiedades si esta especie no se encuentra en la isoforma a la que se le asocian principalmente estos beneficios saludables.

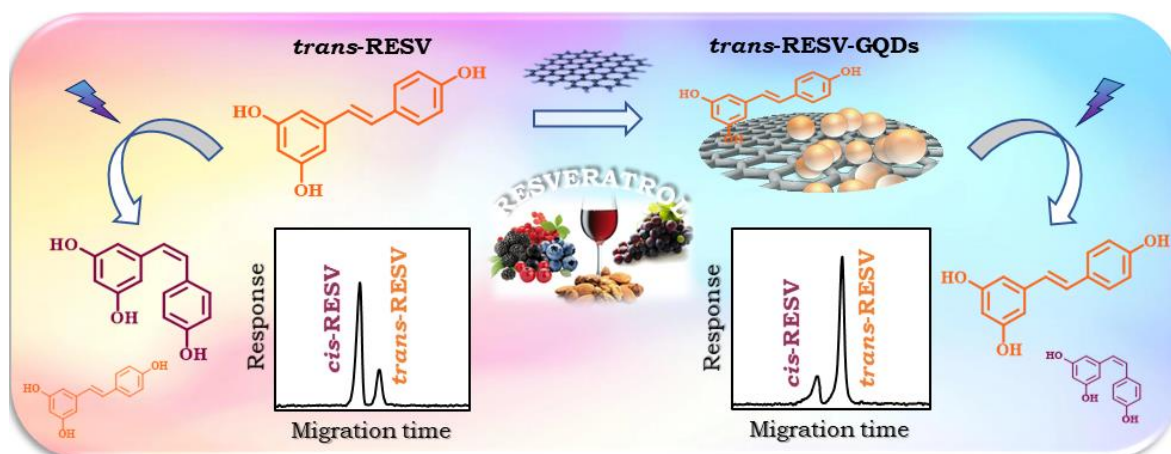
Referencias

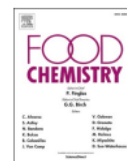
1. Ahmadi, Z.; Mohammadinejad, R.; Ashrafizadeh, M. Drug delivery systems for resveratrol, a non-flavonoid polyphenol: Emerging evidence in last decades. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* **2019**, *51*, 591-604.
2. Colica, C.; Milanović, M.; Milić, N.; Aiello, V.; De Lorenzo, A.; Abenavoli, L. A systematic review on natural antioxidant properties of resveratrol. *Natural Product Communications* **2018**, *13*(9), 1195-1203.
3. Berman, A. Y.; Motechin, R. A.; Wiesenfeld, M. Y.; Holz, M. K. The therapeutic potential of resveratrol: a review of clinical trials. *NPJ Precision Oncology* **2017**, *1*(1), 1-9.
4. Takaoka, M. Of the phenolic substrate of hellebore (*Veratrum grandiflorum* Loes. fil.). *Journal of Faculty of Science, Hokkaido Imperial University* **1940**, *3*, 1-16.
5. Meng, X.; Zhou, J.; Zhao, C. N.; Gan, R. Y.; Li, H. B. Health benefits and molecular mechanisms of resveratrol: A narrative review. *Foods* **2020**, *9*(3), 340-366.
6. Singh, A. P.; Singh, R.; Verma, S. S.; Rai, V.; Kaschula, C. H.; Maiti, P.; Gupta, S. C. Health benefits of resveratrol: Evidence from clinical studies. *Medicinal Research Reviews* **2019**, *39*(5), 1851-1891.
7. Tosato, M. G.; Vicendo, P.; Thomas, A. H.; Lorente, C. Clearing up the photochemistry of resveratrol: Effect of the solvent. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2018**, *367*, 327-331.
8. Karadag, A.; Ozcelik, B.; Saner, S. Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food Analytical Methods* **2009**, *2*(1), 41-60.
9. Lobo, V.; Patil, A.; Phatak, A.; Chandra, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews* **2010**, *4*(8), 118-126.
10. Gülçin, İ. Antioxidant properties of resveratrol: a structure–activity insight. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* **2010**, *11*(1), 210-218.

11. Fiod Riccio, B. V.; Fonseca-Santos, B.; Colerato Ferrari, P.; Chorilli, M. Characteristics, biological properties and analytical methods of *trans*-resveratrol: A review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **2020**, *50*(4), 339-358.
12. Sharkawy, A.; Casimiro, F. M.; Barreiro, M. F.; Rodrigues, A. E. Enhancing *trans*-resveratrol topical delivery and photostability through entrapment in chitosan/gum Arabic Pickering emulsions. *International Journal of Biological Macromolecules* **2020**, *147*, 150-159.

V.1. Graphene quantum dots an efficient nanomaterial for enhancing the photostability of *trans*-resveratrol in food samples

Food Chemistry 2022, 386, 132766-132777





Graphene quantum dots an efficient nanomaterial for enhancing the photostability of *trans*-resveratrol in food samples

Esther Pinilla-Peñalver^{a,b,2}, Beatriz García-Béjar^{a,3}, Ana M. Contento^{a,4}, Ángel Ríos^{a,*,1}

^a Department of Analytical Chemistry and Food Technology, University of Castilla-La Mancha, Avenue Camilo Jose Cela s/n 13004, Ciudad Real, Spain

^b Regional Institute for Applied Chemistry Research, IRICA, Avenue Camilo Jose Cela s/n 13004, Ciudad Real, Spain

Highlights

- The photo-instability of resveratrol biologically active isomer is largely inhibited.
- Resveratrol adsorption to carbon-based nanostructures confers stability to the polyphenol.
- Resveratrol-loaded graphene quantum dots offer a high antioxidant activity.
- Graphene quantum dots used are shown to be non-toxic in model microorganisms.

Abstract

Given the health-promoting properties associated with *trans*-resveratrol consumption and knowing its photochemical instability, as it rapidly isomerizes to the less biologically active conformer, the photoprotective role of a carbon-based nanomaterial was investigated. Adsorption of resveratrol on graphene quantum dots (GQDs), synthesized from uric acid, produces a considerable inhibition in the *trans*-to *cis*-resveratrol conversion process under light-induced radiation, conferring photostability to the bioactive. The influence of different parameters affecting the adsorption efficiency and loading capacity of resveratrol on GQDs was explored. Several characterization techniques confirmed this interaction, even proving to be non-toxic at the concentration at which the maximum inhibition of isomerization occurs. This adsorption also implies an increase in the antioxidant capacity of the polyphenol. The photoprotective effect was evaluated in food samples, resulting in a considerable slowing down of isomerization. This fact confirms the potential of GQDs to be an effective vehicle of *trans*-resveratrol to supplement food systems.

Keywords

Trans-Resveratrol; Chemical stability; Stereoisomeric inhibition; Carbon-based nanomaterial; Additives; Food samples.

V.1.1. Introduction

Resveratrol is a well-known non-flavonoid polyphenol, belonging to the family of stilbenes which structure consists of two phenolic rings linked by a double bond which facilitates two isomeric conformations: *trans*- and *cis*-resveratrol. Such compound is present in a wide variety of plant species including those producing blueberries and blackberries, peanuts and grapes, and therefore the wine produced from them.¹ Skin of the red grapes and related products are deemed as the main dietary sources of resveratrol. Resveratrol has aroused widespread interest due to its health-promoting properties, including antioxidant, anticarcinogenic, antibacterial, antidiabetic, anti-inflammatory and neuroprotective effects,^{2,3} playing a crucial role in the prevention of many human diseases.^{4,5} These biological properties and health benefits are mainly associated with the *trans*-isoform which is the predominant form owing to the lower steric hindrance that exists in its structure.^{6,7} For all these beneficial aspects, there is great interest in including resveratrol as a nutraceutical ingredient in food products. However, resveratrol presents deficient oral bioavailability due to its reduced aqueous solubility⁸ which exceedingly limits its therapeutic efficiency, as well as reduced stability against different stress situations undergoing isomerization or degradation in the face of changes in pH, temperature and mainly under light irradiation.⁹ A solution of *trans*-resveratrol, the most stable geometric isomer, has been shown to be quickly isomerized to the *cis*-form when exposed to sunlight or UV radiation, ensuing in a mix of both isomers.^{10,11} As the light irradiation time increases, more *cis*-isomer is generated until the conversion of one isomer to another stabilizes. Due to the quick and easy isomerization of such polyphenolic compound, it is important to promote its photostability against this external factor to avoid the photoisomerization as much as possible, since the ingestion of a product with less healthy properties is not biologically interesting, being able to take its analogue that is who has them.

For a molecule to exert biological activity, it must be able to reach the site of action without losing its integrity and be able to cross cell membranes. So far, encapsulation in several nano-sized delivery systems including emulsions^{12, 13} and polymeric nanoparticles (NPs),¹⁴ among others, has been shown to improve many of the issues associated with this bioactive. Although some of the aforementioned drawbacks for this type of bioactive compounds can be solved in this way, the protection of encapsulated hydrophobic nutraceuticals compounds from degradation remains limited, specially under adverse conditions such as UV light.¹⁵

The structure of silica and carbon-based NPs facilitates the efficient adsorption of bioactive compounds and their subsequent controlled release due to their porosity, as well as the properties of their surface which can be easily modified depending on the target analyte.¹⁶⁻¹⁸ Nevertheless, in conventional carbon nanomaterials despite being less cytotoxic than silica, due to their high hydrophobicity, the application in drug delivery is seriously hampered. Their hydrophobic character can be improved by modifying the surface with oxidized groups, thus promoting its potential to deliver insoluble molecules.¹⁹ In this context, graphene quantum dots (GQDs) is an emerging carbon-based nanomaterial that may be a good candidate for use in this application. GQDs consists of nano-sized graphene single or multiple sheets with a closely packed honeycomb structure with sp^2 hybridization of carbon atoms,²⁰ providing π - π electrostatic interactions and hydrogen bonding sites. On the contrary to graphene layers, GQDs posses' special properties involving water solubility, high biocompatibility demonstrated by cytotoxicity assays, appropriate antioxidant activity for scavenging different kinds of free radicals^{21, 22} and excellent optical and electronic properties, also characterized by being chemically inert and by its great photostability by quantum confinement and edge effect.^{23, 24}

Here, a new application of GQDs has been investigated. Specifically, it is used as a photoprotective nanomaterial for resveratrol providing stability to the polyphenol against UV light and avoiding to a great extent its rapid isomerization. To control the magnitude of this effect, an improved electrophoretic (CE) method (test) has been used for the separation and quantification of both resveratrol isomers. In the present

study, different parameters that affect the adsorption efficiency (AE) and loading capacity (LC) of resveratrol in the nanomaterial were studied to achieve the maximum inhibition of the bioactive isomeric transformation. Furthermore, Fourier-transform infrared (FT-IR) and fluorescence spectroscopy techniques were employed to determine the molecular interaction between the adsorbent and adsorbate. Thermogravimetric techniques were also used to study the physical state of resveratrol-loaded GQDs. Successful results are presented here, being able to assist in the design of upcoming nanocarriers for the stabilization and release of resveratrol and other polyphenols.

V.1.2. Materials and methods

V.1.2.1. Reagents and materials

All aqueous solutions were prepared with analytical grade reagents, unless otherwise stated, and deionized water purified with a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA). *Trans*-resveratrol ($\geq 99.0\%$) was purchased from Sigma Aldrich (Madrid, Spain) and *cis*-resveratrol ($\geq 98.0\%$), apart from being obtained from the *trans*-isomer by the influence of light, from Cayman Chemical (Ann Arbor, Michigan, USA). Sodium acetate anhydrous ($> 99.0\%$), acetic acid ($> 99.7\%$), potassium phosphate monobasic ($\geq 99.0\%$), sodium phosphate dibasic ($\geq 99.0\%$) and sodium hydroxide ($> 98.0\%$) were bought from Sigma Aldrich (Madrid, Spain) while sodium tetraborate anhydrous ($\geq 98.0\%$) was acquired from Fluka Chemie (Buchs, UK). Stock buffer solutions of 0.1 M borate were used to prepare working solutions as background electrolytes. To fix the pH in the samples, 0.1 M of acetic acid-acetate and phosphate stock buffers solutions were preprepared. Uric acid ($\geq 99.0\%$) was purchased from Alfa Aesar (Kandel, Germany) and sulfuric acid (98%) was acquired from Labkem (Barcelona, Spain). Absolute ethanol (99.8%), methanol ($\geq 99.9\%$), acetonitrile ($\geq 99.9\%$), tetrahydrofuran ($\geq 99.9\%$), hydrochloric acid (37%) and acetone ($\geq 99.9\%$) were obtained from PanReac (Barcelona, Spain). All solutions were stored in darkness at 4 °C.

2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS, $> 98.0\%$), potassium persulfate ($\geq 99.0\%$) and (\pm)-6-hydroxy-2,5,7,8-

tetramethylchromane-2-carboxylic acid (Trolox, 97.0%) were also used and acquired from Sigma Aldrich (Madrid, Spain).

Toxicity assay was carried out employing microorganisms from the Spanish Type Culture Collection (CECT) or the University of Castilla-La Mancha (UCLM) yeast collection. Specifically, *Escherichia coli* (*E. coli*, CETC 515) and *Bacillus cereus* (*B. cereus*, CETC 148) were selected as model bacteria and *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*, UCLMS 3) and *Candida albicans* (*C. albicans*, UCLM 1662) as model yeasts. For this study, Trypto-Casein Soy Broth (TSB) and Yeast extract Peptone Dextrose (YPD) broths were used to inoculate bacteria or yeast, respectively. TSB was acquired from Biokar diagnostic-Bioser (Barcelona, Spain) while YPD was prepared using 10 g L⁻¹ yeast extract, 20 g L⁻¹ peptone and 20 g L⁻¹ glucose, all of them purchased from PanReac (Barcelona, Spain). Cultures were grown on the Plate Count Agar (PCA) bought from Scharlab (Barcelona, Spain) for bacteria and YPD agar for yeasts.

V.1.2.2. Instrumentation

CE measurements were achieved using an Agilent model G1600AX CE instrument (Palo Alto, CA, USA) equipped with a diode array detector (DAD). An uncoated fused-silica capillary (39.5 cm total length, 31 cm effective length and 75 µm internal diameter) (Beckman, Fullerton, CA) was used.

Absorption spectra were obtained on a SECOMAM UVI Light XS 2 spectrophotometer equipped with a LabPower V3-50 for absorbance data acquisition using 10 mm quartz cuvettes. Fluorescence spectra were recorded on a QuantaMaster40 spectrofluorometer from Photon Technology International equipped with a 75 W continuous xenon short-arc lamp using a detector voltage of 981 V. SOC-10 USB interface FelixGX software was used to collect and process fluorescence data. Emission and excitation slit widths were both 2 nm unless otherwise specified.

Particle size distribution and polydispersity index were determined by dynamic light scattering (DLS) measurements using a Zetasizer Nano system (Malvern Instruments Limited, Spain) at 25 °C using ultrapure water as the dispersing medium.

FT-IR spectra of the solid samples were conducted in an attenuated total reflectance (ATR) crystal of ZnSe in a Shimadzu IR instrument, IR-Affinity-1S model and DTGS Standard detector.

Thermogravimetries were carried out using a Setaram SDT Q600 equipment, providing signals associated with heat flow (Differential Scanning Calorimetry, DSC).

Density functional theory (DFT) calculations were performed with the GAUSSIAN 16 suite of programs at B3LYP/6-31G(d,p) level.

pH measurements were carried out in a Crison Basic 20 pH-meter with a combined glass electrode (Barcelona, Spain). An ultrasound bath (J. P. Selecta, Barcelona, Spain), a microcentrifuge BioSan Microspin 12 (LabNet Biotecnica S. L., Madrid, Spain), a vortex stirrer V05 series (LBX instruments, Madrid, Spain) with speed control and 254/365 nm UV lamp 230 V, E2107 model, Consort nv (Turnhout, Belgium) were also used.

V.1.2.3. Synthesis and purification of graphene quantum dots

For the preparation of carboxylated GQDs, a chemical oxidation of uric acid was achieved by acidic treatment via a modified process previously reported by our group.²⁵ This synthesis procedure has been previously detailed in Chapters II and III.1, omitting such information here. As an additional step to that described above, the resulting solution containing the nanomaterial obtained after the purification process with the methanol:acetone mixture and subsequent removal of the solvent was finally subjected to a dialysis process for ca. 72 h to remove small molecular weight by-products.

V.1.2.4. Preparation of resveratrol-loaded graphene quantum dots

Resveratrol stock standard solution was prepared by dissolving a certain amount of the polyphenol in ethanol to achieve a concentration of 248 mg L⁻¹. Working solutions of *trans*-resveratrol were prepared by diluting the stock standard solution in ultrapure water. For *trans*-resveratrol-loaded GQDs preparation, 6.5 mg of the dried nanomaterial were suspended in 0.5 mL of 20 mg L⁻¹ resveratrol standard solutions, previously adjusted to pH 3.5 with 15 mM acetic acid-acetate buffer

solution. The mixture was vortexed for 30 s and further incubated for 2 h under gentle magnetic stirring in the absence of light at room temperature. The final ethanol volume in the sample was kept at 8% (v/v).

AE and LC of *trans*-resveratrol onto the carbon-based nanomaterial were estimated using the equations shown below (Equations 1 and 2, respectively):

$$\text{Adsorption efficiency (\%)} = \frac{([t\text{-resv}]_{\text{with GQDs}} - [t\text{-resv}]_{\text{free}})_{\text{after irradiation}}}{[t\text{-resv}]_{\text{free before irradiation}}} \cdot 100 \quad \text{Eq (1)}$$

All *trans*-resveratrol concentrations were calculated from the electropherograms obtained using the CE analytical method described later in section “*Quantification of resveratrol isomers by capillary electrophoresis*”. So, $[t\text{-resv}]_{\text{with GQDs after irradiation}}$ corresponds to the total concentration of *trans*-resveratrol in the presence of the carbon-based nanomaterial after being irradiated for 30 min of UV light at 365 nm, $[t\text{-resv}]_{\text{free after irradiation}}$ indicates the concentration of this isomer without GQDs once it is irradiated with light for the same time and finally, $[t\text{-resv}]_{\text{free before irradiation}}$ is the initial concentration of *trans*-resveratrol without being exposed to UV radiation.

On the other hand, the LC of the bioactive onto the nanomaterial was calculated as follows:

$$\text{Loading capacity (\%)} = \frac{\text{Loaded amount of } t\text{-resv}}{\text{Weight of nanomaterial}} \cdot 100 \quad \text{Eq (2)}$$

where the loaded amount of *trans*-resveratrol is known thanks to the AE equation and the weight of nanomaterial is the total mass of GQDs used to adsorb and protect the polyphenol.

V.1.2.5. Kinetic study of UV light-induced resveratrol isomerization

To know how the light radiation time affects the photostability of resveratrol and determine the reaction order with respect to the starting isomer in the photochemical conversion, freshly prepared 20 mg L⁻¹ *trans*-resveratrol solutions, free and adsorbed onto GQDs, were placed into transparent glass vials and exposed to

UV radiation (365 nm) for different times without interruption. The vials were placed 15 cm from the 6 W light source with $610 \mu\text{W cm}^{-2}$ intensity (at the base of the lamp). The concentration of *trans*-isomer was always known by the electrophoretic control method, from the corrected peak areas referred to an external standard.

Kinetics of this isometric transformation can be measured in terms of the rate of disappearance of the reactant (*trans*-resveratrol) or that of the product formation (*cis*-resveratrol). The integrated rate equations for order zero (Equation 3), one (Equation 4), and two (Equation 5) are as follows:

$$[t\text{-resv}]_t = [t\text{-resv}]_0 - k \cdot t \quad \text{Eq (3)}$$

$$\ln [t\text{-resv}]_t = \ln [t\text{-resv}]_0 - k \cdot t \quad \text{Eq (4)}$$

$$\frac{1}{[t\text{-resv}]_t} = \frac{1}{[t\text{-resv}]_0} + k \cdot t \quad \text{Eq (5)}$$

These experiments were carried out for both free resveratrol and resveratrol-loaded GQDs. To experimentally determine the reaction order with respect to *trans*-isomer, the results obtained for each of the integrated rate equations described above were graphically represented, so that one reaction order or another is obtained when the fit of the rate equation is that of a straight line.

V.1.2.6. Adsorption isotherm models

Adsorption process of resveratrol to the nanomaterial that allows protection against UV light was investigated using Langmuir and Freundlich isotherm models. Langmuir model indicates monolayer adsorption on distinct localized sorption places with no transmigration of the adsorbate in the surface plane and assumes uniform energies onto the surface of the adsorbent.²⁶ The linear form of Langmuir isotherm model is represented as follows (Equation 6):

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{q_m} C_e + \frac{1}{K_L \cdot q_m} \quad \text{Eq (6)}$$

where, C_e corresponds to the adsorbate concentration at equilibrium (mg L^{-1}), q_e is the adsorption capacity at equilibrium (mg g^{-1}), q_m is the maximum adsorption capacity (mg g^{-1}) and K_L is Langmuir constant (L mg^{-1}).

Freundlich isotherm describes adsorption processes that arise heterogeneously on the surface and in active sites with different energies based on equilibrium multilayer adsorption.²⁶ The linearized form of Freundlich isotherm is expressed as (Equation 7):

$$\log q_e = \frac{1}{n} \log C_e + \log K_F \quad \text{Eq (7)}$$

where, q_e is the adsorption capacity at equilibrium (mg g^{-1}), C_e corresponds to the adsorbate concentration at equilibrium (mg L^{-1}), n refers to the adsorption intensity (dimensionless) and K_F is Freundlich constant (mg g^{-1}). A value of $1/n$ smaller means a more heterogeneous surface and an n value between 1 and 10 indicates a favourable process.²⁷

V.1.2.7. Quantification of resveratrol isomers by capillary electrophoresis

Prior to the first use of the capillary, conditioning is required by flushing with 1 M HCl (5 min), deionized water (5 min), 1 M NaOH (10 min), deionized water (5 min) and finally with the fresh electrolyte solution (10 min).

The optimal running electrolyte was 40 mM sodium tetraborate aqueous solution at pH 9.5. The applied voltage for the electrophoretic separation was set at 10 kV providing an average current of around 65 μA . A temperature of 25 °C was selected as optimum in the separation. Samples were injected by hydrodynamic injection mode at 50 mbar of pressure for 8 s. In all analyses, peaks were identified and quantified by monitoring the measurement wavelength at 303 nm.

The capillary was rinsed between runs with 0.1 M NaOH (2 min) followed by deionized water (2 min) and fresh running electrolyte (5 min), to ensure reproducibility in the measurement, applying 2 bar of pressure in the external pump. Analyses were performed in triplicate sample and duplicate analysis and corrected peak areas (area/migration time) were used for the quantification.

All solutions, except samples containing resveratrol, were filtered through a 0.45 μm nylon membrane prior to analysis to avoid clogging the capillary.

V.1.2.8. Toxicity assay

Toxicity assays of resveratrol, GQDs and resveratrol adsorbed on the carbon-based nanomaterial were performed *in vitro* at different concentration ratios between resveratrol and nanomaterial, in duplicate analysis. Then, bacteria cultures were inoculated in TSB at 37 °C for 24 h without agitation while yeast strains did so in YPD broths at 30 °C for 24 h with slight stirring conditions (150 rpm). Overnight cultures were grown as a lawn on the PCA for bacteria and YPD agar plate for yeasts. Subsequently, cellulose disks, absorbed with each of the compounds, were placed onto the surface of the agar plates and the whole system were incubated for 24 h at 37 °C (bacteria) or 30 °C (yeasts). Results were revealed by observation of the presence or absence of inhibition halo.

V.1.2.9. Antioxidant activity determination by ABTS assay

The method is based on the ability of an antioxidant compound to reduce ABTS^+ (radical cation) into its colourless form relative to that of a reference antioxidant such as Trolox, which is a simple phenol analogous of vitamin E.²⁸ The higher the antioxidant capacity of the extract, the greater the loss of colour and, therefore, a decrease in absorbance, proportional to the degree of scavenging of the oxidized radical. For cationic radical ABTS generation from the salt, a stock solution was prepared by mixing 7 mM of ABTS salt and 2.45 mM of potassium persulfate. The mixture was kept in the dark for 12 – 14 h at room temperature before use. The working ABTS^+ solution was obtained by diluting the stock in ethanol (1:90, v/v) for performing spectrophotometric measurements, achieving an initial absorbance value of 0.7 ± 0.02 at 734 nm. An aliquot of 20 μL of the compound, in the absence and presence of the nanomaterial, was added to 3 mL of ABTS^+ working solution. For the blank and standard curve, 20 μL of ethanol or Trolox solution were used, respectively. The absorbance at 734 nm was determined immediately after addition and quick mixing and then after 5 min. Readings at $t = 0$ min ($A_t = 0$) and $t = 5$ min ($A_t = 5$) of reaction were used to calculate the percentage inhibition value for the

compound in both cases. A standard reference curve was constructed by plotting inhibition values (%), obtained from equation 8, against Trolox concentration (0.1 – 1.0 mM). The radical-scavenging activity (RSA) of the compound was quantified as millimoles of Trolox equivalents per gram of polyphenol. Each sample was analysed three times with duplicate analysis.

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{\left(A_{\text{sample (t=0)}} \cdot A_{\text{blank (t=5)}} \right) - \left(A_{\text{sample (t=5)}} \cdot A_{\text{blank (t=0)}} \right)}{\left(A_{\text{sample (t=0)}} \cdot A_{\text{blank (t=0)}} \right)} \cdot 100 \quad \text{Eq (8)}$$

V.1.2.10. Samples treatment

Food samples tested were purchased at local markets (beverages) and pharmacies (dietary supplements). Beverages were diluted 1:4 times, setting their pH to 3.5 with a 0.1 M aqueous solution of acetic acid-acetate buffer and achieving a final concentration of 15 mM of the salt. Finally, enriched beverages with 20 mg L⁻¹ of resveratrol and 8% ethanol were subjected to the analytical method to check the validation. In addition, *Resveradox Forte* and *Aquilea Resveratrol* food supplements-containing resveratrol were evaluated. For the preparation of these samples, different amounts of the powder inside the capsules were dissolved in ethanol. After that, the corresponding suspension was quickly filtered through a pleat filter to remove dark particles that remain undissolved. Then, an aqueous dilution was prepared from the previous one, preserving 8% ethanol to keep resveratrol in solution and fixing the pH to 3.5 with acetic acid-acetate buffer to achieve a final saline concentration of 15 mM. Finally, the samples were subjected to the analytical procedure and its content was calculated by external calibration. Also, the obtained concentrations were corroborated by standard addition procedure. For this, food supplements were enriched at four concentration levels of *trans*-resveratrol, from 2 to 14 mg L⁻¹ in the case of *Resveradox Forte* and between 2 and 8 mg L⁻¹ in *Aquilea Resveratrol* sample.

In order to study the photostability of free and adsorbed resveratrol to GQDs in commercial samples, beverages and food supplements, the isomerization inhibition process towards the formation of *cis*-resveratrol was evaluated. For that, the samples-containing resveratrol were incubated with 6.5 mg of GQDs, optimal conditions to achieve the highest photostability of the polyphenol when loaded on the

nanomaterial. To evaluate the desired effect, four different analyses were performed for each sample and each one measured in triplicate. Two of them correspond to samples with resveratrol in the lack of light irradiation, one in the absence and the other in the presence of GQDs. The other two types of analysis consist of resveratrol-containing samples irradiated with UV light for 30 min, one in the absence and the other in the presence of the carbon-based material. Thus, by comparing the analytical signals of both resveratrol isomers obtained from the electropherograms corresponding to the absence and presence of the GQDs, the times that the isomeric transformation of resveratrol is inhibited when the polyphenol is adsorbed to the nanomaterial are obtained.

V.1.3. Results and discussion

V.1.3.1. Optimization of the separation of resveratrol isomers by capillary electrophoresis

The optimization of the CE procedure was carried out by evaluating the effect of the experimental parameters that can influence the separation efficiency of resveratrol isomers, the migration time and its sensitivity. It is known that the pH of the background electrolyte plays an important role in the separation of ionizable compounds in CE, because it determines the extent of ionization of analytes, as well as the net electric charges on the inner wall of the capillary which in turn determines the direction and magnitude of the electroosmotic flux (EOF). Therefore, this parameter is crucial to contemplate since it influences the electrophoretic mobilities of the compounds. pKa values of the polyphenol isomers range from 8.9 – 10.6 for the hydroxyl groups. Considering these values, it is reasonable to study the separation efficiency of the compounds at pH values of the background electrolyte solution in the 8.5 – 10.5 range. A pH of 9.5 was selected as optimal to obtain the best separation between the resveratrol isomers in a short analysis time (**Figure V.1.1a**). Furthermore, the concentration of the background electrolyte is also an important parameter that influences the separation. The influence of the concentration of sodium tetraborate solution from 10 to 50 mM on the migration time at pH 9.5 was assessed. At increasing concentrations of the buffer, which is corresponding to increase the ionic

strength, the retention times of the compounds increased and the separation between both was improved (**Figure V.1.1b**). A concentration of 40 mM of borate buffer was chosen for providing a good shape of well-separated peaks and low current. Subsequently, applied voltage in the range between 3 to 15 kV was also evaluated (**Figure V.1.1c**). In all cases, migration times of the analytes decreased considerably, and their corresponding peaks were sharpened when increasing the separation voltage. Voltages higher than 12 kV generate a strong Joule effect because of the higher current produce inside the capillary which caused peak broadening and reduced separation efficiency.²⁹ Lower voltages imply longer migration times and, although the separation efficiency between peaks is greater, the resolution is not improved due to the broadening of the peaks. Therefore, as a compromise between both separation efficiency and migration time of the compounds, a voltage of 10 kV was selected as optimum. Moreover, different temperatures were examined showing all of them a similar separation efficiency between both resveratrol isomers over the entire temperature range. Shorter migration times were obtained as the temperature increases (**Figure V.1.1d**), therefore 25° C was selected as optimum, turning out to be the usual temperature in the work environment. The role of pressure in the separation efficiency of resveratrol isomers was investigated in the 20 to 50 mbar range (**Figure V.1.1e**). As expected, 50 mbar of pressure led to shortened migration times improving the sensitivity of the peaks, and therefore this pressure value was chosen as most favourable for the CE procedure. To improve sensitivity, injection time for standard solutions between 5 to 15 s was studied. It was checked that the peak current increased as the injection time was longed. Nevertheless, when the injection time was higher than 10 s the peaks of the compounds were broadened and overlapped, thus, 8 s for injection time were selected as optimal.

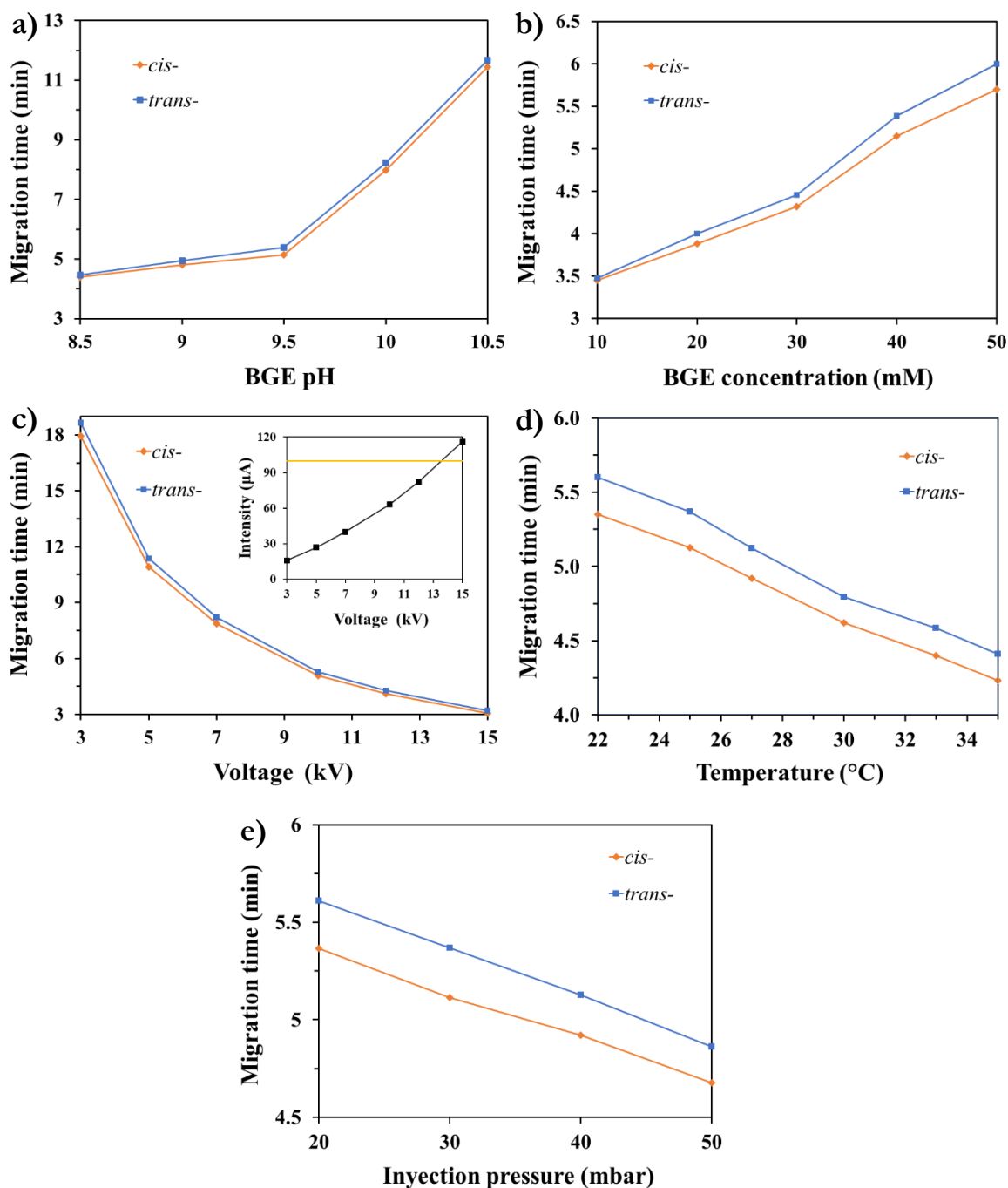


Figure V.1.1. Optimization of the control electrophoretic method for the determination of resveratrol isomers.

This electrophoretic method allowed the fast and efficient separation of both isomers due to the difference in the charge/size ratio. As both species have the same charge, the difference in mobilities depends on the size variable. The closeness of the two aromatic rings in the *cis*-resveratrol structure makes its size slightly larger than in the case of the molecule in the *trans*-position. This may be due to the fact that in the *cis*-conformation, for reasons of steric hindrance, one ring is in the plane and the other

is offset from it, while in the *trans*-geometry both rings are in the planar position, as verified by DFT calculations (**Figure V.1.2**). Based on the migration times, it can be deduced that *trans*-resveratrol has an effective mobility ($1.18 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$) slightly higher than that corresponding to *cis*-isomer ($8.90 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$).³⁰ This indicates that the smaller anions migrate towards the anode faster than the larger anions and, therefore, *trans*-resveratrol molecules are more resistant to being entrained by the EOF. That is the reason why *cis*-resveratrol migrates before *trans*-isomer.

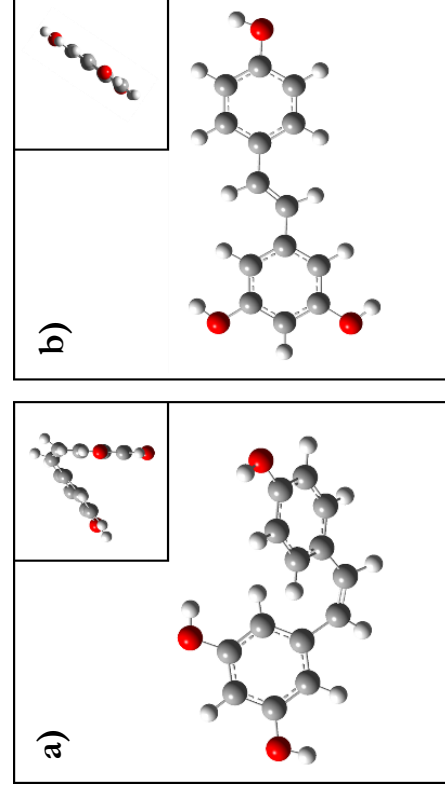


Figure V.1.2. Optimized structure of the (a) *cis*- and (b) *trans*-geometries of resveratrol molecule.

Subsequently, the analytical performance characteristics of the proposed procedure will be evaluated.

V.1.3.2. Analytical features for the determination of resveratrol isomers

To study the possible applicability of the ensuing GQDs as resveratrol adsorbent material, providing greater photostability which leads to the slowdown of the isomeric transformation when irradiated with light, CE was used as separation and quantification technique of *trans*- and *cis*-resveratrol. For this, different variables were previously optimized to achieve a quick and efficient separation of both isomers. Thanks to the electropherograms obtained, we selected the experimental conditions that ensured that the transformation of *trans*-resveratrol took place only in the *cis*-isomer. *Cis*-isomer was obtained from *trans*-resveratrol after exposure to light (**Figure V.1.3**), and the analytical standard of the *cis*-isomer was used to be able to be identified and quantified. By using a DAD, the identity of each peak could be verified not only by their migration times, but also by overlapping the UV-Vis spectra

obtained with those of a standard, as well as ensuring the purity of the peaks. The maximum absorption wavelength of *trans*-resveratrol was fixed to obtain electropherograms, at this wavelength the *cis*-isomer also shows good absorption.

The CE method used was validated through an exhaustive study of the main analytical parameters such as specificity, linearity, sensitivity, accuracy and precision. A good linear relationship between peak area/migration time ratio (corrected peak area) and the corresponding resveratrol isomer concentration was achieved. On the one hand, a linearity range from 0.2 to 25.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ was obtained for *trans*-resveratrol while the one found for the *cis*-isomer was between 1.0 and 30.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The precision of the analytical method for determining resveratrol isomers was evaluated in terms of repeatability and reproducibility and is expressed as relative standard deviation (RSD). To test the repeatability of the electrophoretic procedure, five injections of 9 mg L^{-1} of *trans*-resveratrol standard and 15 mg L^{-1} of *cis*-one were performed, obtaining RSD values of 1.1 and 0.8% for corrected peak area, respectively. This process was repeated over three consecutive days to evaluate the precision in terms of reproducibility ($n = 15$) and RSD values of 2.1 and 1.3% were found.

Detection and quantification limits (LOD and LOQ) were calculated and experimentally corroborated to evaluate the sensitivity of the checking method used. According to the LODs attained, 0.06 and 0.30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for *trans*- and *cis*-isomer, respectively, a greater sensitivity in the detection of *trans*-resveratrol at the measurement wavelength was obtained. Sensitivity results are logical because the detector for both cases was set to the maximum absorption wavelength of *trans*-isomer, 303 nm (**Figure V.1.3**). More details regarding the statistical parameters of the electrophoretic procedure for both resveratrol isomers are summarized in **Table V.1.1**.

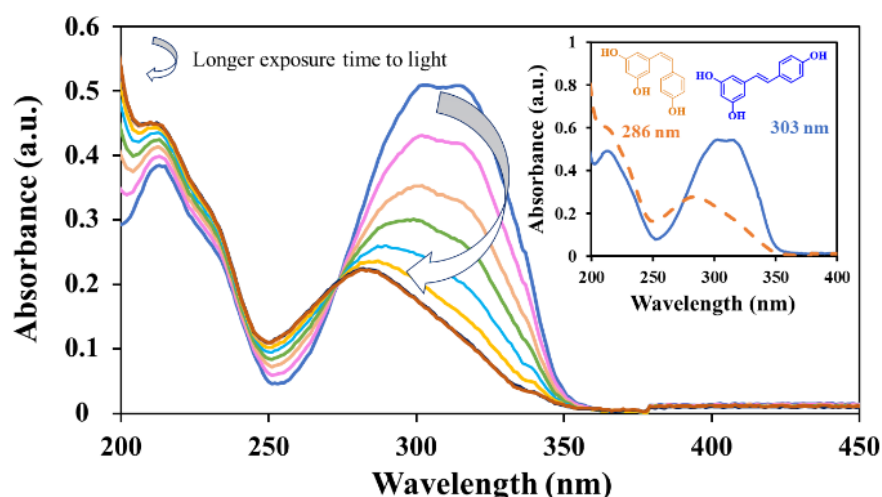


Figure V.1.3. *Cis*- (abs_{max} 286 nm) and *trans*-resveratrol (abs_{max} 303 nm) absorption spectra. *Cis*-resveratrol was obtained from the *trans*-isomer by UV irradiation.

Table V.1.1. Figures of merit of the proposed method for the quantification of resveratrol isomers.

Parameter	<i>cis</i> -Resveratrol	<i>trans</i> -Resveratrol
Equation	$y = (-0.61 \pm 0.16) + (1.40 \pm 0.01)x$	$y = (-0.05 \pm 0.20) + (1.72 \pm 0.02)x$
Linear range ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1.0 – 30.0	0.2 – 25.2
R ²	0.999	0.998
LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0.30	0.06
(%) RSD ^(a)		
Migration time	0.13	0.15
Corrected peak area	0.77	1.11
(%) RSD ^(b)		
Migration time	0.19	0.22
Corrected peak area	1.34	2.06

^(a) Relative standard deviation in terms of repeatability ($n = 5$) under *intra*-day conditions.

^(b) Relative standard deviation in terms of reproducibility ($n = 15$) under *inter*-day conditions.

The accuracy of the method was evaluated by fortifying several commercial food samples, which could contain the polyphenol, with 20 mg L⁻¹ of both *cis*- and *trans*-resveratrol standard solutions. Such samples were treated as described in section “*Samples treatment*” and subsequently submitted to the analytical procedure summarized in section “*Quantification of resveratrol isomers by capillary electrophoresis*”, obtaining the recovery values shown in **Table V.1.2**. As can be seen, values ranging between $92.6 \pm 2.0\%$ and $100.4 \pm 1.0\%$ for *cis*-isomer and from $93.6 \pm 1.7\%$ to

102.5 ± 1.1% for *trans*-isomer were obtained, which shows the validity of this analytical method to quantify both isomers in the tested samples.

Table V.1.2. Determination of resveratrol isomers in enriched food samples.

Sample	Found concentration* ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		Recovery* (%)	
	<i>cis</i> -Resveratrol	<i>trans</i> -Resveratrol	<i>cis</i> -Resveratrol	<i>trans</i> -Resveratrol
Red berries infusion	19.13 ± 0.36	18.72 ± 0.35	95.6 ± 1.8	93.6 ± 1.7
Red wine 'Rioja'	19.27 ± 0.38	19.25 ± 0.46	96.4 ± 1.9	96.2 ± 2.3
Red wine 'Rias Bajas'	19.61 ± 0.18	19.47 ± 0.18	98.1 ± 0.9	97.4 ± 0.9
Tomato juice	19.90 ± 0.18	20.50 ± 0.23	99.5 ± 0.9	102.5 ± 1.1
Cranberry juice	18.52 ± 0.40	17.94 ± 0.41	92.6 ± 2.0	89.7 ± 2.1
Lychee drink	20.07 ± 0.19	19.83 ± 0.22	100.4 ± 1.0	99.1 ± 1.1
Green tea	19.68 ± 0.22	19.72 ± 0.28	98.4 ± 1.1	98.6 ± 1.4

*Analysis performed by triplicate ($n = 3$).

Moreover, this analytical method was applied to dietary supplements (*Resveradox Forte* and *Aquilea Resveratrol*) that endogenously contain resveratrol in their composition according to manufacturer specifications. In *Resveradox Forte* dietary supplement (**Figure V.1.4a**), no interfering compounds were observed in the matrix and in the freshly prepared samples only *trans*-resveratrol was detected and not the *cis*-isomer. The concentration of *trans*-resveratrol present in this food supplement was calculated by external and standard addition calibration obtaining values of 54.4 ± 1.1 and 55.0 ± 2.1 mg/capsule, respectively. No significant differences were found by the two calibration methods ($\alpha = 0.05$). Both concentration values are very similar with the one declared by the manufacturer, as can be seen in **Table V.1.3**.

Other dietary product containing-resveratrol, named *Aquilea Resveratrol*, was also analyzed (**Figure V.1.4b**). In this case, two peaks with migration times at around 5.4 and 9.9 min were observed in the electropherograms obtained. The first of the peaks were identified as *trans*-resveratrol while the second one as quercetin, another polyphenol contained in the sample as stated on the product label. **Table V.1.3** also summarizes the *trans*-resveratrol content of this sample quantified by external

calibration and corroborated by standard addition calibration, obtaining concentration values of 13.8 ± 0.5 and 13.9 ± 0.3 mg/capsule, respectively. The results obtained are consistent with each other for both types of calibration, being slightly higher than the concentration declared on the product label for resveratrol.

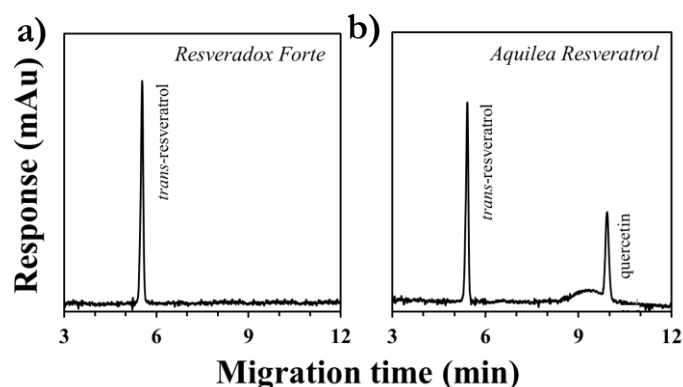


Figure V.1.4. Analyses of (a) *Resveradox Forte* and (b) *Aquilea Resveratrol* food supplements by the electrophoretic method used.

Table V.1.3. Analyses of *trans*-resveratrol content in nutraceutical supplements by the electrophoretic method using external calibration and standard addition. Statistical comparison between the values obtained by both calibration methods.

Sample	Declared (mg/capsule)	Found by external calibration (mg/capsule), ($n = 3$)	Found by standard addition (mg/capsule), ($n = 3$)	Experimental t Student value* t_{exp}
<i>Resveradox Forte</i>	50	54.39 ± 1.12	55.04 ± 2.06	0.48
<i>Aquilea Resveratrol</i>	12	13.79 ± 0.53	13.90 ± 0.27	0.32

* t_{crit} ($\alpha = 0.05$; 4 degrees of freedom; 2 tails) = 2.78.

V.1.3.3. Evaluation of the optimal adsorption conditions of *trans*-resveratrol on graphene quantum dots

As previously mentioned, it is desirable that most of resveratrol is found as a *trans*-isomer and for this it is necessary to promote its stability against some external factors, specifically against the incidence of light. That is why some authors have studied how different nanomaterials provide stability to this polyphenol when it is subjected to different stress situations.³¹⁻³³ In this work, preliminary studies showed that the synthesized GQDs²⁵ exhibit a considerable photoprotection of

trans-resveratrol by the adsorption to this nanomaterial, largely inhibiting the conversion towards *cis*-isomer. To control the magnitude of this effect, the previously detailed electrophoretic method was used to separate and quantify both isomers of resveratrol when they are free or adsorbed on GQDs.

To minimize the quick stereoisomeric transformation of resveratrol in presence of light radiation, the experimental variables that provided higher isomeric inhibition or, in other words, higher AE and LC of *trans*-resveratrol in GQDs were exhaustively investigated. **Figure V.1.5a** shows the variation of the analytical signal corresponding to both resveratrol isomers in the absence and presence of 2 mg of the nanomaterial for different times of light irradiation. At 30 min of incidence of light, the maximum inhibition of resveratrol isomeric transformation was obtained. From here, all the studies performed to optimize the desired effect were carried out at this time of exposure to UV light.

The stability of the synthesized GQDs was previously evaluated against uninterrupted UV irradiation conditions. Its fluorescence did not show to be altered for at least 1 h under these drastic stress conditions, demonstrating its ability to be used in the desired application. In addition, their UV-Vis absorption profiles also did not show alteration until at least 5 months after their synthesis.

V.1.3.3.1. Effect of solvent

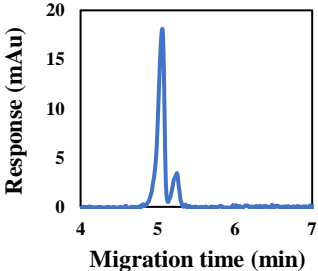
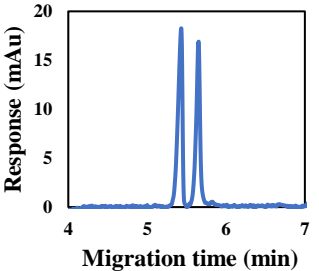
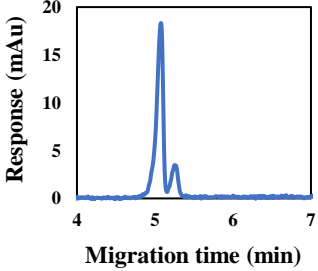
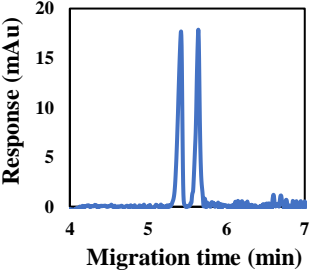
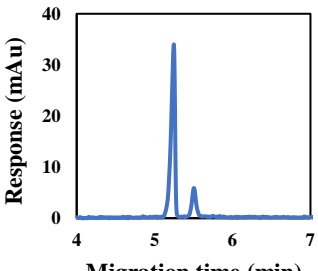
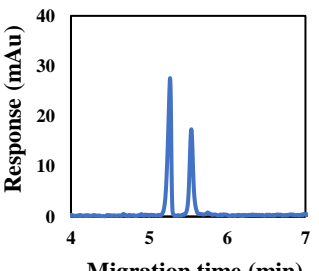
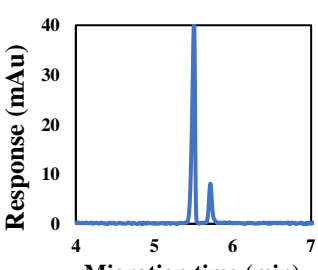
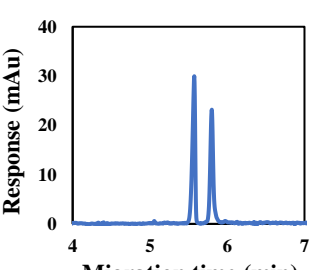
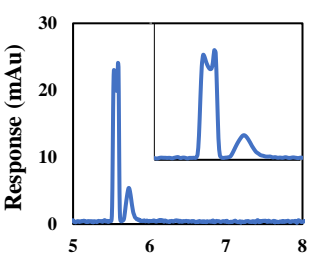
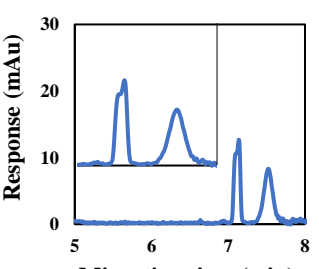
First, the effect of solvents with different polarity (acetonitrile, ethanol and tetrahydrofuran) in inhibiting of the formation of the *cis*-isomer was evaluated. For that, dilutions in deionized water of 20 mg L⁻¹ of *trans*-resveratrol from stock solution (in the corresponding organic solvent) were prepared, always keeping 8% of the organic solvent. Such free resveratrol samples were irradiated with UV light and their photostability was compared with those in which resveratrol is adsorbed to GQDs. Resveratrol-loaded carbon-based nanomaterial showed better stability against UV radiation for all tested solvents compared to when it is free. The maximum AE and, therefore, the lowest conversion to the less active isomer was obtained when the bioactive was initially dissolved in ethanol, followed by that prepared in acetonitrile and finally in tetrahydrofuran (**Figure V.1.5b**). Of the three solvents tested, it was

that of intermediate polarity that increased the inhibition of the isomeric transformation the most. Furthermore, it should be noted that ethanol is a protic solvent with an acid group in its structure being able to favour the formation of hydrogen bonds between the polyphenol and the nanomaterial. However, the other solvents studied are aprotic and thus this type of bond is not favoured. Therefore, ethanol was selected for demonstrating the best AE of *trans*-resveratrol to the nanomaterial. Additionally, it is the most benign agri-food solvent and is recognized as GRAS (Generally Recognized as Safe) by the FDA (Food and Drug Administration).

V.1.3.3.2. Effect of pH

Subsequently, the AE of *trans*-resveratrol onto GQDs after irradiation with light for 30 min was also optimized as a function of the pH of the medium. In this sense, it was considered to evaluate the pH stability of resveratrol and GQDs. Resveratrol has been found in literature to be relatively stable in acidic conditions, whereas its degradation rate exponentially increases in alkaline ones.³⁴ On the other hand, the nanomaterial was shown to be stable and apparently well dispersed in solution over a wide range of pH, even at acidic pH values, conditions in which they are synthesized. According to the previous considerations, the effect of pH between 3.0 and 7.0 on free resveratrol and resveratrol-loaded GQDs was examined, fixing a saline concentration of 20 mM with acetic acid-acetate or phosphate buffers. In the electropherograms obtained, it was observed that at pH values equal or above 6.5, resveratrol is not stable and other by-products were detected. **Table V.1.4** shows the electropherograms corresponding to free and loaded resveratrol in GQDs throughout the pH range studied. **Figure V.1.5c** shows the signal ratios of resveratrol isomers (*trans*/*cis*-resveratrol), both when free and loaded on the nanomaterial. Although there are no major changes due to the pH effect, the results revealed that the highest inhibition of the transformation towards *cis*-isomer was slightly favoured at pH 3.5, indicating the maximal photoprotection provided by the nanomaterial. This effect could be attributed to the greater ease of GQDs layers to self-assemble³⁵ and, therefore, the morphological characteristics would be more favourable to resveratrol adsorption.

Table V.1.4. pH optimization study in the isomerization process of 20 mg L⁻¹ resveratrol solutions for 30 min under UV irradiation in the absence of and presence of GQDs as photoprotective nanomaterial.

pH value	Resveratrol without photoprotection	Resveratrol photoprotected with GQDs	Times of isomerization inhibition
3.0			4.7
3.5			5.1
4.5			4.2
5.5			4.3
6.5			--

V.1.3.3.3. Effect of ionic strength

At pH 3.5 fixed with acetic acid-acetate buffer, the effect of ionic strength between 5 and 25 mM in the resveratrol adsorption process was also evaluated. It was observed that the isomeric photoconversion of *trans*-resveratrol increased its inhibition as the ionic strength of the medium was higher until it reached 15 mM, remaining practically constant or even decrease such inhibition for higher salt concentration values (**Figure V.1.5d**). This behavior can be explained in terms of salting-in and salting-out effects,³⁶ which are attributed to electrostatic interactions between *trans*-resveratrol and the NPs as a function of salt concentration.

V.1.3.3.4. Effect of adsorbent amount

Finally, to conclude the optimization, the inhibition of the transformation towards the appearance of the *cis*-isomer was evaluated maintaining 20 mg L⁻¹ of the initial isomer and the amount of nanomaterial was varied between 0.5 and 8.0 mg. As can be seen in **Figure V.1.5e**, the results revealed a negligible inhibition when the bioactive is attached to GQDs with respect to the photoisomerization that deprotected *trans*-resveratrol undergoes until employing 1 mg of the adsorbent nanomaterial, while when this amount was increased, the photostability of the *trans*-isomer was considerably improved until 6.5 mg of GQDs was used. Higher amounts also detracted from the desired effect. Therefore, quantities in the 5.0 – 6.5 mg of the nanomaterial are recommended to achieve the maximum protective effect of *trans*-resveratrol related to photoconversion to its *cis*-isomer. Considering these conditions, the LC and AE of the nanomaterial in order to protect the *trans*-isomer from the photoisomerization towards the formation of *cis*-resveratrol, using the most favorable signals of the analytical method, were 0.13% and 83.7%, respectively.

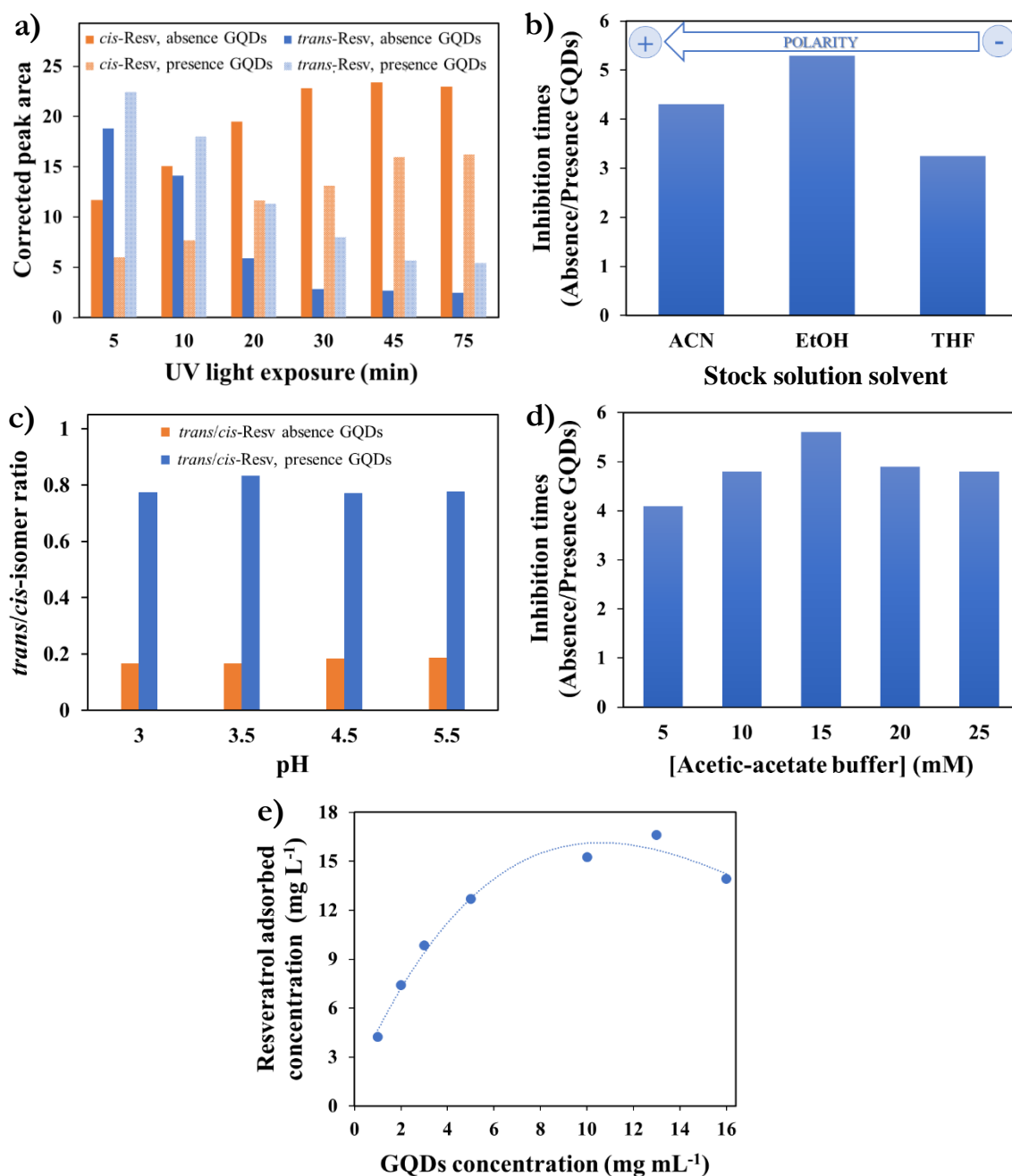


Figure V.1.5. Optimization of the inhibition process of resveratrol isomeric transformation based on the maximal adsorption efficiency of the polyphenol to the nanomaterial.

V.1.3.4. Characterization of resveratrol-loaded graphene quantum dots

The information about the characterization of the GQDs obtained after the synthesis, without modifying any of its conditions, has been omitted since it has been previously detailed in Chapter III of this Memory. However, the results found under the conditions selected for the present study are detailed below.

Once the best adsorption conditions of *trans*-resveratrol on GQDs were selected in terms to protect their photostability, the material loaded and unloaded with *trans*-resveratrol was characterized. For that, the nanocomposite was slowly dried under a stream of nitrogen before use.

Figures V.1.6a and **V.1.6b** show the fluorescent emission spectra of *trans*-resveratrol, GQDs and *trans*-resveratrol-loaded GQDs, exciting both the wavelength of maximum absorbance of the *trans*-isomer ($\lambda_{\text{exc}} = 303 \text{ nm}$) and that of the nanomaterial ($\lambda_{\text{exc}} = 356 \text{ nm}$), all of them carried out under the same experimental conditions. The fluorescence of GQDs originates from the quantum confinement effect and its entire structure comprising its basal plane and its functionalities is considered a single fluorophore. The obtained results by fluorescence measurements revealed that the intrinsic fluorescence of GQDs is notably quenched in the presence of *trans*-resveratrol, indicating the interaction between the fluorophore and the polyphenol.

On the other hand, **Figure V.1.6c** shows FT-IR spectra of GQDs, *trans*-resveratrol and the corresponding profile to the polyphenol adsorbed to the nanomaterial. FT-IR profile of undoped GQDs, coloured in blue, shows the characteristic peaks at 3150 and 3062 cm^{-1} suggesting the presence of N-H stretching vibrational modes of amine groups. Bands at 2830 and 612 cm^{-1} are associated to aliphatic CH stretching and deformation vibrations attributed to any alkane fragments of the aromatic framework, respectively. Peaks located between 1688 and 1408 cm^{-1} are assigned to C=O, C=C, C-O-H stretching modes of the aromatic rings. At 1107 cm^{-1} there is an intense band associated to C-N bending modes. The green spectrum shown in **Figure V.1.6c** represents the characteristic bands of the chemical bonds corresponding to the functional groups of *trans*-resveratrol. The broad band located at 3209 cm^{-1} refers to O-H stretching vibration of phenolic hydroxyl bonds. At 3010 cm^{-1} there is a narrow and low-intensity band associated to the =C-H axial stretching of aromatic hydrogen which confirms the presence of unsaturation. Bands located at 1605 – 1581 cm^{-1} are related to the stretching of C=C bonds of the aromatic rings. In addition, the peaks at 1510 cm^{-1} and 1444 cm^{-1} reflected the benzene skeleton vibrations and C–C stretching vibration as evidenced by the peak at 1381 cm^{-1} . The

presence of the band that appears at 1146 cm^{-1} indicates the C-O bond stretching for phenolic compounds. The =C-H band for the alkene in the *trans*-configuration of the molecule is located at 962 cm^{-1} . The stretching between 866 and 765 cm^{-1} is characteristic of =C-H vibration bands of arene conjugated to the olefinic group and finally the deformation bands corresponding to =C-H of the olefinic group are those positioned at $680 - 500\text{ cm}^{-1}$. As can be observed in this figure when comparing the profiles of the three samples, mainly the fingerprint region between 960 and 1220 cm^{-1} is modified when the nanomaterial is loaded with resveratrol in comparison to when it does not. Specially, this change is produced in the intense band located at 1107 cm^{-1} of GQDs, attributed to C-N vibrations, that upon loading with resveratrol is unfolded. Therefore, some of the interactions between both species probably occurs through the nitrogen of the amino groups of the nanolayers. Moreover, a new band of resveratrol fingerprint appears at 995 cm^{-1} when resveratrol is adsorbed on the GQDs. Slight alterations or deviations are also observed around 1580 cm^{-1} .

The hydrodynamic size distributions of GQDs and resveratrol-loaded GQDs were determined using the DLS technique (**Figure V.1.6d**). A hydrodynamic particle size distributed mainly between 5 and 13 nm with an average size of 7.6 nm was found for GQDs with resveratrol-loaded. This size turned out to be slightly larger than that obtained for the downloaded GQDs at the same pH, which presented an average size of 6.7 nm , also obtaining a slightly higher polydispersity index.

Finally, to assess the physical state of *trans*-resveratrol after loading into the nanomaterial, DSC thermograms of free resveratrol, GQDs and resveratrol-loaded GQDs were performed and are collected in **Figure V.1.6e**. Resveratrol clearly showed a sharp peak at 264 °C corresponding to its melting point, which indicates a crystalline nature.¹⁸ GQDs exhibited an endothermic peak at 213 °C with much less intensity. However, such peaks disappeared in the thermogram corresponding to *trans*-resveratrol-loaded on GQDs. In the latter case, only appears a very small endothermic peak shifted at 198 °C . This could be due to a drastic change in the percentage of crystallinity of the polyphenol after loading on GQDs, which may

indicate that *trans*-resveratrol was molecularly dispersed in the nanomaterial losing most of its crystallinity.

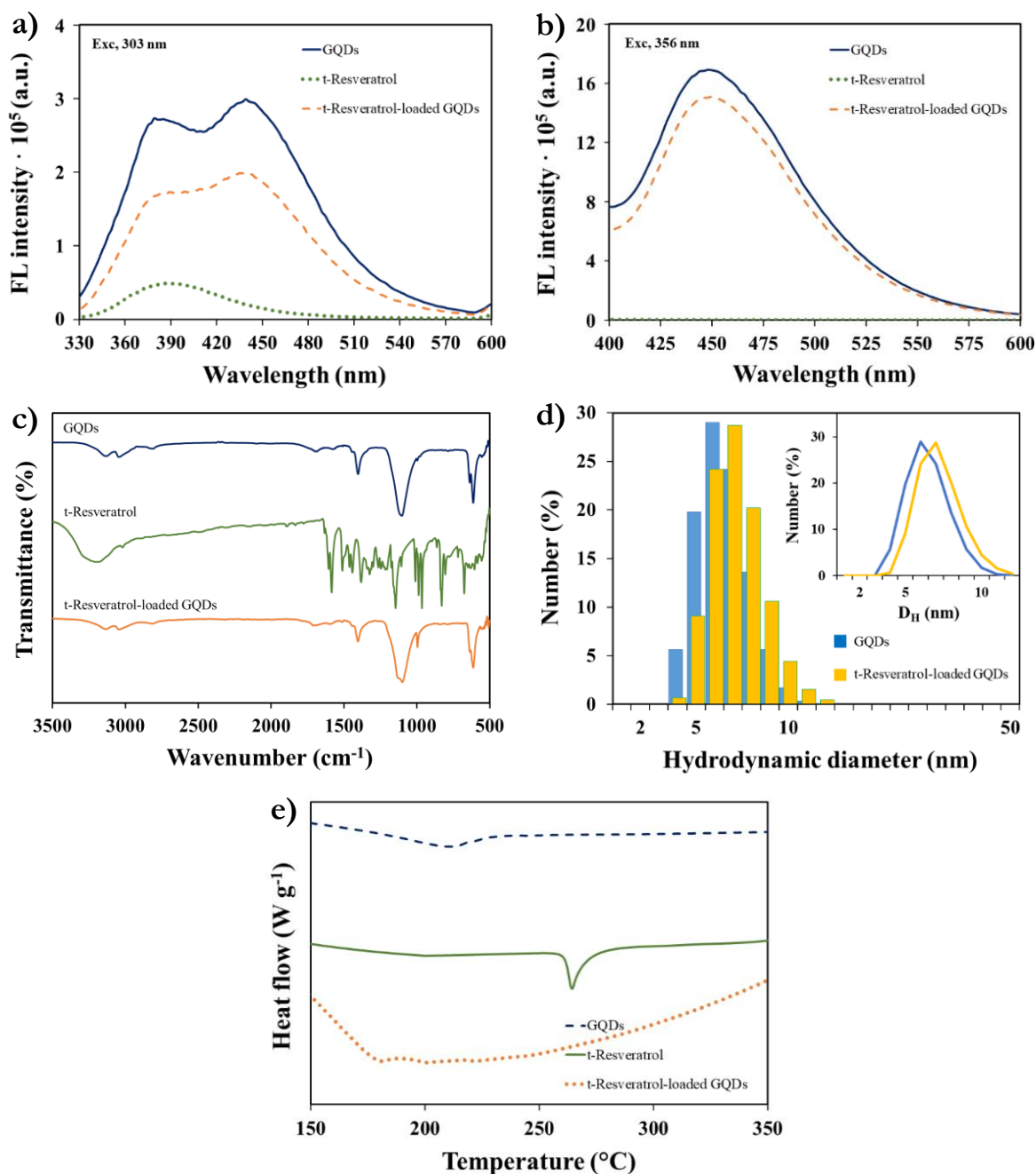


Figure V.1.6. Characterization of resveratrol-loaded GQDs. (a) Fluorescence curves, exciting at 303 nm and (b) at 356 nm; (c) FT-IR analyses; (d) DLS measurements and (e) DSC profiles under N₂ atmosphere.

V.1.3.5. Photoisomerization kinetics of free and loaded *trans*-resveratrol in graphene quantum dots

As mentioned above, the presence of *trans*-resveratrol in the liquid state and its irradiation with light are enough conditions for the photochemical conversion to *cis*-isomer to take place. *Trans*-resveratrol solutions were evaluated under its exposure to UV radiation at 365 nm and sunlight. It was observed that as the exposure time increased, the *trans*-isomer peak area was decreasing while the *cis*-one was increasing. UV radiation at 365 nm turned out to be much more reproducible in terms of isomeric transformation, since it is a controlled light exposure, while solar light is not consistent throughout the day or in successive days, and thus it is very difficult to reproduce the conditions of transformation. Therefore, the conversion of one isomer to other was followed using UV radiation for the subsequent experiments. This light radiation was previously used for adsorption conditions optimization. It was observed that this photo-induced chemical reaction occurs until a certain time of exposure, up to ca. 40 min, after which, *trans*-resveratrol stops transforming to the *cis*-one, that is, there is always a small proportion of the *trans*-isomer always remains, around 10%, even though its exposure to light continues.

According to the obtained experimental results at different times of exposure to UV radiation and representing the rate integrated equations for order zero, one and two (**Figure V.1.7**), it can be observed how the disappearance rate equation of *trans*-resveratrol when it does not bind to GQDs follows second order kinetics with respect to the concentration of such analyte with a coefficient of determination $R^2 = 0.992$ and a rate constant of $k = 60.66 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (v_1). However, when the *trans*-isomer is attached to the nanomaterial, the rate equation best fits first order kinetics with respect to *trans*-isomer with a determination coefficient $R^2 = 0.998$ and whose rate constant is $k = 4 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ (v_2). Therefore, the isomeric conversion rate under light radiation is much slower than when resveratrol is adsorbed to GQDs than when it is not, which indicates that the carbon-based nanomaterial confers photostability to the analyte, resulting in a partial inhibition towards the formation of the *cis*-isomer. Due to the dissociation of the complex formed by *trans*-resveratrol and GQDs, there is always a certain amount of free *trans*-resveratrol which would follow its normal

biology, being able to be isomerized to the *cis*-conformation when irradiated with light.

The rate equations for the photoisomeric transformation of resveratrol when it is free (Equation 9, fast isomerization) and adsorbed to the nanomaterial (Equation 10, slow isomerization) are as follows:

$$v_1 = 60.66 [t\text{-resv}]^2 \quad \text{Eq (9)}$$

$$v_2 = 4 \cdot 10^{-4} [t\text{-resv}] \quad \text{Eq (10)}$$

For example, when the standard solution of *trans*-resveratrol with an initial concentration of $8.8 \cdot 10^{-5}$ M (20 mg L^{-1}) is subjected to 20 min of exposure to UV, the conversion to *cis*-isomer occurs, remaining $1.2 \cdot 10^{-5} \pm 8.8 \cdot 10^{-7}$ M ($2.7 \pm 0.2 \text{ mg L}^{-1}$) of the starting isomer, while when the analyte attaches to GQDs and during the same irradiation time, a smaller amount of resveratrol is isomerized remaining $5.7 \cdot 10^{-5} \pm 1.6 \cdot 10^{-6}$ M ($13.0 \pm 0.4 \text{ mg L}^{-1}$), that is, a concentration of $4.5 \cdot 10^{-5} \pm 1.8 \cdot 10^{-6}$ M ($10.3 \pm 0.4 \text{ mg L}^{-1}$) less is isomerized when resveratrol is adsorbed on the nanomaterial. According to this, during this time of UV light irradiation, $87 \pm 1\%$ of *trans*-resveratrol undergoes a photochemical reaction when it is unprotected, while only $35 \pm 2\%$ is transformed to the *cis*-isomer when the polyphenol increases its photostability by adsorbing to GQDs.

If rate constants of the same equation order are compared, in the case of order one they are $1.1 \cdot 10^{-3}$ and $4 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ for free and adsorbed resveratrol to GQDs, respectively. This indicates that when the resveratrol is absorbed in the nanomaterial the reaction rate is almost 3 times slower and therefore the isomeric transformation is largely inhibited, providing photostability to the polyphenol. The same effect indicates the comparison between second-order rate constants, which in this case are 60.66 and $6.63 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ for free resveratrol and resveratrol-loaded GQDs, respectively. In this case, the constant ratio is even more remarkable, more than 9 times higher.

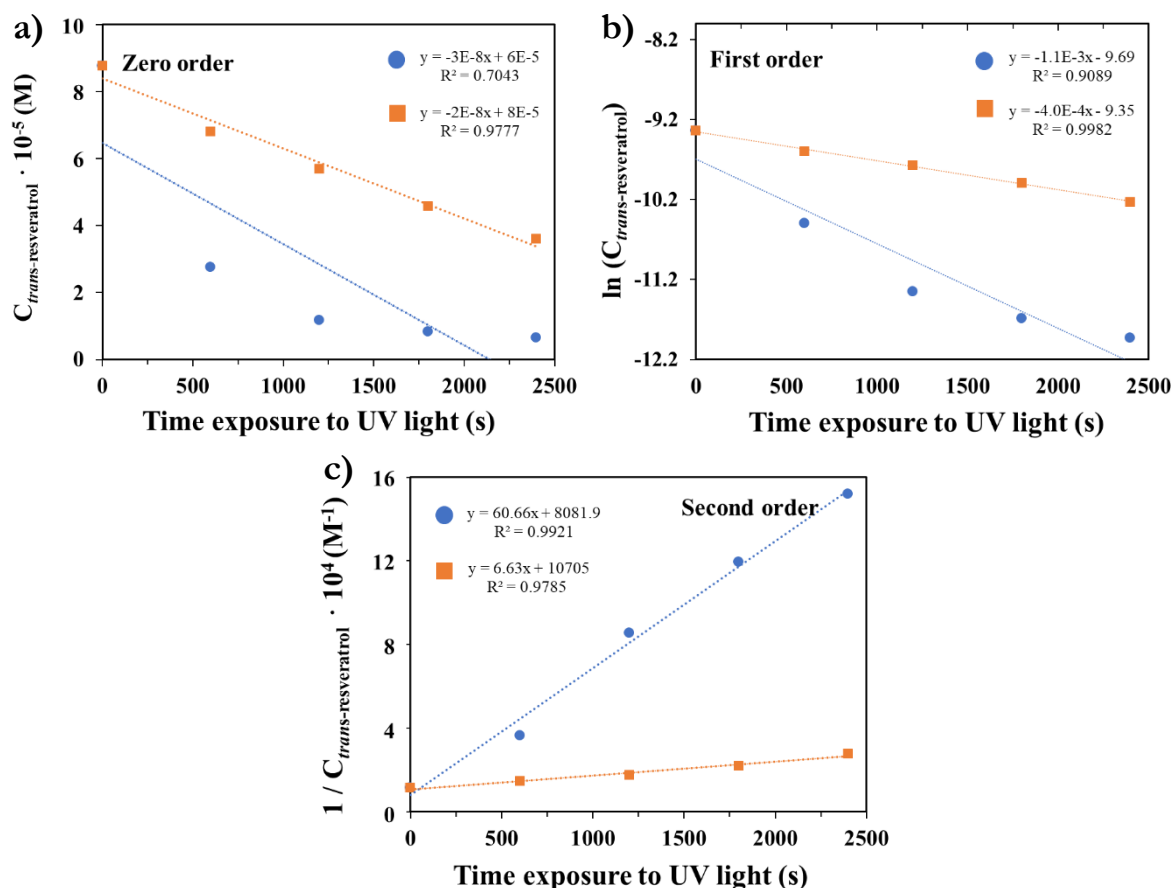


Figure V.1.7. Kinetic study of the isomeric transformation of resveratrol based on the disappearance of the initial isomer (*trans*-isomer) as a function of the time exposure to light for reaction order (a) zero, (b) one and (c) two. Free resveratrol is represented in blue and adsorbed resveratrol in orange.

V.1.3.6. Toxicity study

The toxicity of graphene-derived nanomaterials is closely related to the great diversity of these depending on the particle size, the functional groups of the surface, the oxygen content, the surface charges and the impurities,³⁷ although it is still a matter of ongoing research. Several *in vitro* studies, based on cell cultures, have shown only marginal effects of GQDs on the viability of human cells.³⁸ The high amount of GQDs to which the higher AE is produced and with this, greatest photostability is conferred to the polyphenol when irradiated with UV light, caused us some uncertainty due to its possible toxicity when ingested. Even though many researchers claim that this type of carbon-based nanomaterials are biocompatibility and cause very low toxicity,^{39,40} it was decided to evaluate how these compounds could affect some microorganisms. For this assay, model microorganisms (*E. coli* (gram-negative) and

B. cereus (gram-positive)) and yeasts (*S. cerevisiae* and *C. albicans*) were tested owing to their high prevalence on human microbiota, especially on the human gut.^{41, 42}

The toxicity test performed consisted of visualizing inhibition halos in the microorganisms lawn around a cellulose disk impregnated with the substances tested to check their susceptibility to them (**Figure V.1.8**). In all grown agar plates inoculated with the different materials, even at high amounts of GQDs (6.5 mg), it can be verified that there was no effect on the normal growth of the microorganisms since there was no inhibition halo even at the necessary concentration ratio at which the greatest inhibition towards the formation of *cis*-isomer occurs.

Therefore, it can be concluded that the nanomaterial is non-toxic against the bacteria and yeasts evaluated based on the absence of inhibition halo.

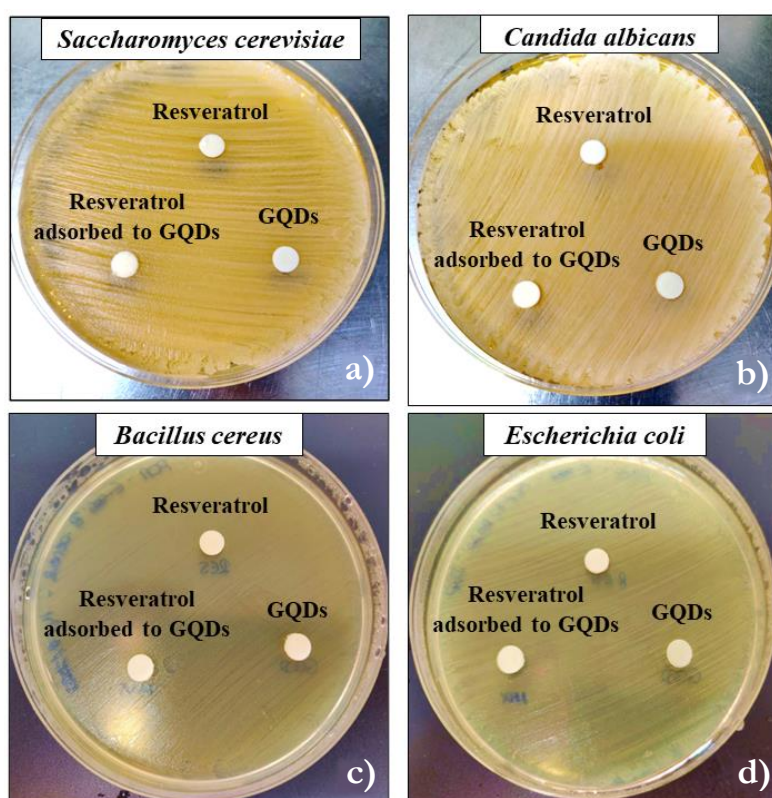


Figure V.1.8. Toxicity test on different model microorganisms; (a, b) yeasts and (c, d) bacteria.

V.1.3.7. Antioxidant capacity of free and loaded resveratrol in graphene quantum dots

Such as many polyphenolic compounds, resveratrol has been found to exhibit different beneficial medicinal and pharmacological activities, especially due to its antioxidant activity.² An antioxidant is a substance capable of neutralizing the oxidizing action of free radicals by releasing electrons, which are captured by free radicals. For this reason, its moderate consumption through the diet is of special importance as it helps to achieve homeostatic balance, which is the normal functioning of the regulatory mechanisms that preserve the physiological state of the organism. Therefore, it is important to evaluate how unprotected resveratrol antioxidant capacity (control) is affected by its adsorption to GQDs. For that, RSA of both species was determined using the ABTS test. In this method, antioxidant activity is evaluated through the reduction of absorbance value at 734 nm when ABTS radical reacted with hydrogen-donating resveratrol (**Figure V.1.9**). RSA values of 8.36 ± 0.38 and 10.39 ± 0.44 $\text{mmol}_{\text{Trolox}} \text{g}_{\text{polyphenol}}^{-1}$ were obtained for *trans*-resveratrol free and loaded on GQDs, respectively. Interestingly, the antioxidant capacity of *trans*-resveratrol was favoured when it was protected with the carbon-based nanomaterial than when it was free. Furthermore, this antioxidant activity was higher than that of the nanomaterial, even also that of the sum of both, so there seems to be a synergy between these activities that may further contribute to the reduction of free radicals.

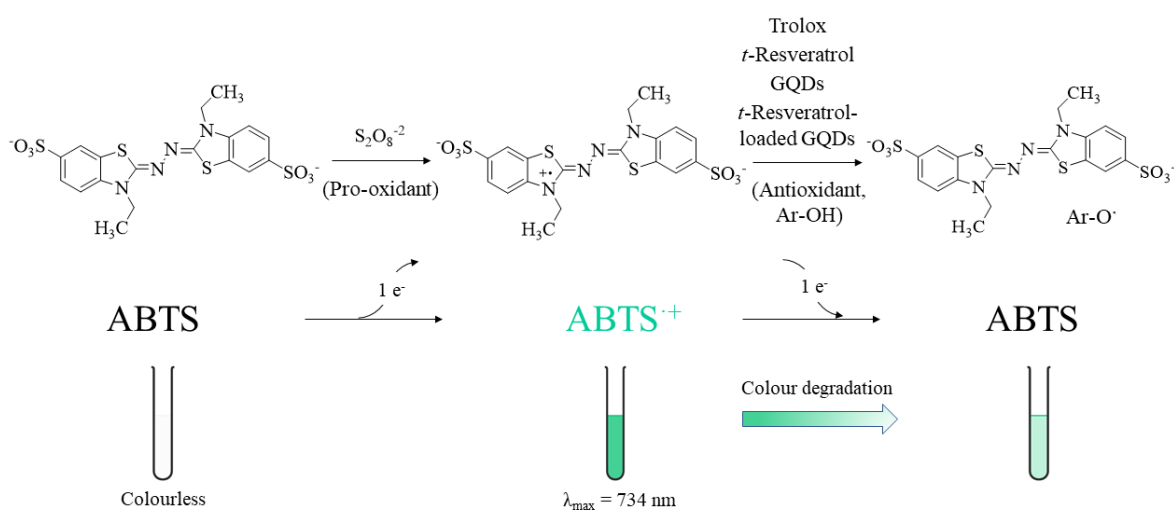


Figure V.1.9. Schematic representation of ABTS radical uptake by antioxidant species (trolox, *trans*-resveratrol, GQDs and *trans*-resveratrol-loaded GQDs).

V.1.3.8. Adsorption isotherm and mechanism

The experimental equilibrium isotherm for the adsorption of *trans*-resveratrol to the nanomaterial was studied. As can be seen in **Figure V.1.10a**, when adsorption reaches equilibrium, there is a relationship between the concentration of the polyphenol at equilibrium (C_e) and the adsorption capacity on the nanomaterial (q_e). This behaviour suggests adsorption affinity of the carbon-based nanomaterial and *trans*-resveratrol. Langmuir and Freundlich isotherms models (Equations 8 and 9) were applied to fit the obtained equilibrium data.

Once the experimental results obtained were represented, it was the Freundlich mathematical model that showed the best fit, since the representation of $\log q_e$ versus $\log C_e$ was adjusted to a straight line with a correlation coefficient of 0.9918 better than that obtained for the case of Langmuir model. Values of 0.79 and 1.27 were respectively found for $1/n$ and n indicating that the adsorption of resveratrol to GQDs was favourably and occurs in multilayer form (heterogeneous surface). In addition, a K_F value of 0.51 mg g⁻¹ was obtained.

The molecular recognition capacity of GQDs could be favoured thanks to π - π electrostatic interactions or hydrogen bonds produced between these NPs and the polyphenolic compound. The interactions would largely prevent the conformational change of the *trans*-isomer. Furthermore, the hydroxyl groups of resveratrol molecules are less hampered in the *trans*-form, more stable conformation, when they interact with the functional groups of the nanomaterial (-OH, -COOH, -NH₂ ...) than when they did so with those of the *cis*-isomer due to the greater steric hindrance of the latter (**Figure V.1.10b**). In addition, the contribution of GQDs to enhance the photostability of *trans*-resveratrol could also be related to the aromatic rings and double bonds of the nanomaterial structure which can absorb UV light,⁴³ thus preventing the *trans*-resveratrol molecules from being affected. In this way, the nanomaterial would help protect the polyphenol from its sensitivity to light radiation. In fact, GQDs concentration has been shown to be an important factor in achieving the maximum AE of the analyte and, therefore, in slowing down the isomeric transformation to *cis*-resveratrol under the stress situation.

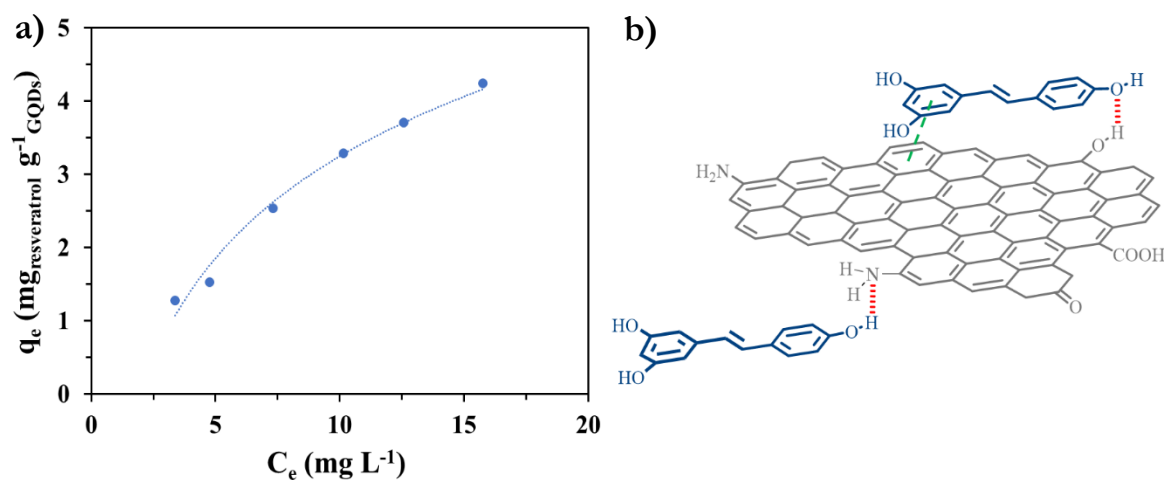


Figure V.1.10. (a) Adsorption isotherm of the polyphenol on the nanomaterial and (b) illustration of the expected interactions between GQDs and resveratrol molecules, namely hydrogen bonding (in red) and π - π stacking (in green)

V.1.3.9. Photostability assessment of *trans*-resveratrol-loaded graphene quantum dots in food samples

Initially, the control CE method was exhaustively validated (**Table V.1.1**) and used for quantitative analytical purposes (**Tables V.1.2** and **V.1.3**) in beverages and food supplements obtaining satisfactory results (see section “*Analytical features for the determination of resveratrol isomers in commercial samples*”). The potential applicability of GQDs to slow the isomeric transformation of resveratrol was demonstrated in the same food products for which the accuracy of the analytical method was studied. Firstly, the samples were treated as described in section “*Samples treatment*” and submitted to the analytical procedure found in section “*Quantification of resveratrol isomers by capillary electrophoresis*”. Subsequently, these samples were exposed to UV light radiation to induce the isomerization process in the absence and presence of GQDs. The photostability of *trans*-resveratrol was evaluated by the inhibition of *cis*-isomer formation, expressed by the relationship between corrected peak areas of *cis*-/*trans*-resveratrol in the absence and presence of GQDs. Thereby, it is possible to calculate the times that this nanomaterial inhibits the isomeric transformation of *trans*-resveratrol with respect to when it is not present.

Since beverages did not contain endogenous resveratrol, they were enriched with 20 mg L⁻¹ of the active isomer. As can be seen in **Table V.1.5**, for all the cases a

high inhibition of *cis*-isomer formation was produced when the nanomaterial is present in them. It is worth highlighting the result obtained for lychee drink and red berries infusion, whose inhibition of the isomeric transformation in both cases was more than 10 times when resveratrol was adsorbed at nanomaterial surface. For the two nutritional products tested that contain the active resveratrol isomer in their composition (*Resveradox Forte* and *Aquilea Resveratrol*), a considerable deceleration was also observed in the generation of the *cis*-isomer when the polyphenol is loaded on the carbon-based nanomaterial compared when it is free (**Figure V.1.11**). Specifically, an isomeric conversion inhibition of 9.3 ± 0.4 and 8.9 ± 0.5 times ($n = 3$) was obtained for *Resveradox Forte* and *Aquilea Resveratrol* matrices, respectively. This inhibitory effect of the isomeric transformation produced by the nanomaterial is detected in the electropherograms obtained for each sample. As an example of an analyte-enriched matrix, **Figure V.1.12** shows the electropherograms corresponding to the lychee drink matrix where the important photoprotective behaviour of GQDs can be observed.

Table V.1.5. Isomeric conversion of *trans*- to *cis*-resveratrol under 30 min of UV radiation in the absence and presence of GQDs for different food samples.

Sample	<i>cis</i> -/ <i>trans</i> -isomer ratio in the absence of GQDs	<i>cis</i> -/ <i>trans</i> -isomer ratio in the presence of GQDs	Inhibition times
Red berries infusion	5.15 ± 0.28	0.50 ± 0.03	10.26 ± 1.01
Red wine 'Rioja'	1.54 ± 0.05	0.28 ± 0.02	5.58 ± 0.34
Red wine 'Rias bajas'	1.51 ± 0.11	0.33 ± 0.03	4.58 ± 0.30
Tomato juice	4.36 ± 0.13	0.55 ± 0.03	7.93 ± 0.43
Cranberry juice	2.64 ± 0.13	0.34 ± 0.02	7.84 ± 0.48
Lychee drink	4.41 ± 0.24	0.38 ± 0.05	11.64 ± 1.08
Green tea	4.13 ± 0.24	0.51 ± 0.04	8.17 ± 0.34
<i>Resveradox Forte</i>	7.11 ± 0.16	0.77 ± 0.02	9.24 ± 0.41
<i>Aquilea Resveratrol</i>	7.71 ± 0.10	0.87 ± 0.04	8.91 ± 0.49

Results expressed as mean value \pm standard deviation ($n = 3$).

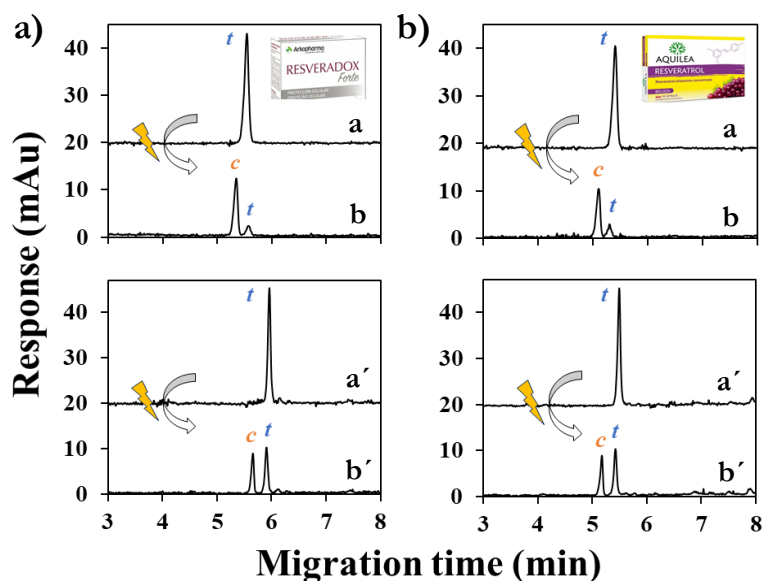


Figure V.1.11. Inhibition effect of *cis*-resveratrol when the photo-induced chemical reaction occurs by exposure for 30 min to UV light in (a) *Resveradox Forte* and (b) *Aquilea Resveratrol* matrices. In the graphs at the top of the figure, resveratrol is unprotected while in the graphs at the bottom it is protected with GQDs. Within the graphs, the letter *a* in bold indicates the moment before light irradiation while the letter *b* in bold indicates the moment after exposure to UV light for 30 min.

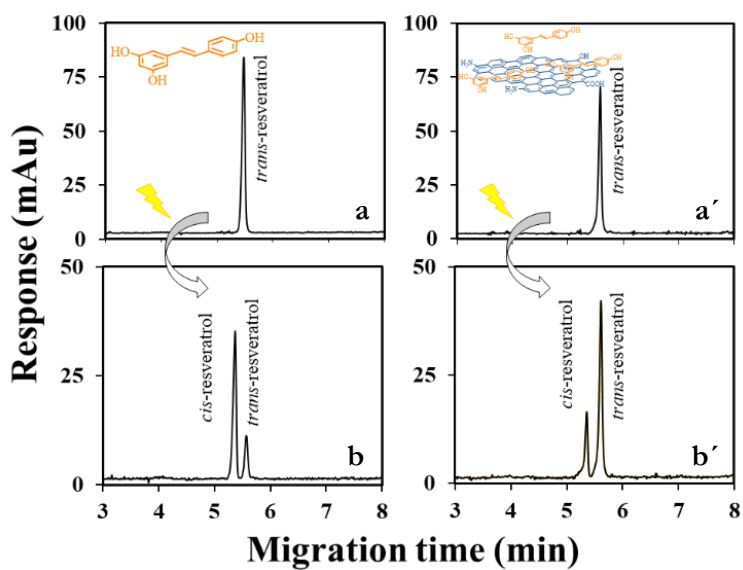


Figure V.1.12. Photostability effect of *trans*-resveratrol adsorbed to GQDs in the lychee drink matrix. Free resveratrol (a) prior to UV light irradiation and (b) after exposure to light for 30 min. Resveratrol-loaded GQDs (a') before and (b') after exposure to light for 30 min.

V.1.4. Conclusions

The photoprotective role of GQDs was investigated by producing a considerable slowdown in the isomeric transformation of resveratrol when it is subjected to stress conditions, such as exposure to light radiation. This effect occurs when resveratrol is attached to the nanomaterial, providing photostability to the biologically active isomer of the polyphenol, *trans*-resveratrol. This fact is of great relevance since it is known that mainly the *trans*-isomer provides health properties, and it would not make sense to consume it as a nutraceutical product since it would not contribute its known beneficial properties. To control such isomeric inhibition process, a simple and sensible electrophoretic method which allowed the quantification of both resveratrol isomers in a sensitive and selective way. The best conditions to adsorb the polyphenol at the nanomaterial surface were evaluated in terms of AE and LC. The results showed a high AE for *trans*-resveratrol, considerably reducing its isomerization process depending on the food product tested. In addition to these promising results, this type of carbon-based nanomaterial showed to be non-toxic to different microorganisms and even the antioxidant capacity of the polyphenol was increased when is adsorbed to GQDs, assuming an improvement in its health-promoting potential. Based on the obtained results, it is suggested that GQDs may be a promising strategy in food or pharmaceutical fields for the adsorption of bioactive compounds with great potential to preserve their properties. Future studies will involve examining other carbon-based nanomaterials prepared from other precursors, testing the effects of surface functionalization, in vitro release, and cytotoxicity studies.

Acknowledgements

The Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO) and the Regional Government of Castilla-La Mancha (JCCM) are gratefully acknowledged for funding this work, with grant numbers PID2019-104381GB-I00 and SBPLY/17/180501/000262, respectively. Esther Pinilla-Peñalver also acknowledges MINECO for the predoctoral contract BES-2017-080357. Authors want to thank Food Technology area of the University of Castilla-La Mancha (UCLM) for the toxicity assay. We also want to thank C. Tardío for carrying out the computational studies and the technical support from High Performance Computing Service of UCLM is also gratefully acknowledged.

References

1. Fabjanowicz, M.; Plotka-Wasyłka, J.; Namieśnik, J. Detection, identification and determination of resveratrol in wine. Problems and challenges. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2018**, *103*, 21-33.
2. Gülçin, İ. Antioxidant properties of resveratrol: a structure–activity insight. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* **2010**, *11*(1), 210-218.
3. Pannu, N.; Bhatnagar, A. Resveratrol: From enhanced biosynthesis and bioavailability to multitargeting chronic diseases. *Biomedicine and Pharmacotherapy* **2019**, *109*, 2237-2251.
4. Murtaza, G.; Latif, U.; Najam-Ul-Haq, M.; Sajjad, A.; Karim, S.; Akhtar, M.; Hussain, I. Resveratrol: An active natural compound in red wines for health. *Journal of Food and Drug Analysis* **2013**, *21*(1), 1-12.
5. Brown, L.; Kroon, P. A.; Das, D. K.; Das, S.; Tosaki, A.; Chan, V.; Singer, M. V.; Feick, P. The biological responses to resveratrol and other polyphenols from alcoholic beverages. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* **2009**, *33*(9), 1513-1523.
6. Shaito, A.; Posadino, A. M.; Younes, N.; Hasan, H.; Halabi, S.; Alhababi, D.; Al-Mohannadi, A.; Abdel-Rahman, W. M.; Eid, A. H.; Nasrallah, G. K. Potential adverse effects of resveratrol: a literature review. *International Journal of Molecular Sciences* **2020**, *21*(6), 2084-2109.
7. Wang, F.; Chatterjee, S. Dominant carbons in *trans*- and *cis*-resveratrol isomerization. *The Journal of Physical Chemistry B* **2017**, *121*(18), 4745-4755.
8. Lepak, A.; Gutmann, A.; Kulmer, S. T.; Nidetzky, B. Creating a water-soluble resveratrol-based antioxidant by site-selective enzymatic glucosylation. *ChemBioChem* **2015**, *16*(13), 1870-1874.
9. Lv, X.; Cong, Z.; Liu, Z.; Ma, X.; Xu, M.; Tian, Y.; Zhang, X.; Xu, B.; Zhang, J.; Tang, Z. Improvement of the solubility, photostability, antioxidant activity and UVB photoprotection of *trans*-resveratrol by essential oil based microemulsions for topical application. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* **2018**, *48*, 346-354.

10. Figueiras, T. S.; Neves-Petersen, M. T.; Petersen, S. B. Activation energy of light induced isomerization of resveratrol. *Journal of Fluorescence* **2011**, *21*(5), 1897-1906.
11. Rigon, R. B.; Fachinetti, N.; Severino, P.; Durazzo, A.; Lucarini, M.; Atanasov, A. G.; El Mamouni, S.; Chorilli, M.; Santini, A.; Souto, E. B. Quantification of *trans*-resveratrol-loaded solid lipid nanoparticles by a validated reverse-phase HPLC photodiode array. *Applied Sciences* **2019**, *9*(22), 4961-4975.
12. Sessa, M.; Balestrieri, M. L.; Ferrari, G.; Servillo, L.; Castaldo, D.; D'Onofrio, N.; Donsì, F.; Tsao, R. Bioavailability of encapsulated resveratrol into nanoemulsion-based delivery systems. *Food Chemistry* **2014**, *147*, 42-50.
13. Zu, Y.; Overby, H.; Ren, G.; Fan, Z.; Zhao, L.; Wang, S. Resveratrol liposomes and lipid nanocarriers: Comparison of characteristics and inducing browning of white adipocytes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2018**, *164*, 414-423.
14. Singh, G.; Pai, R. S. Optimized PLGA nanoparticle platform for orally dosed *trans*-resveratrol with enhanced bioavailability potential. *Expert Opinion on Drug Delivery* **2014**, *11*(5), 647-659.
15. Fan, Y.; Liu, Y.; Gao, L.; Zhang, Y.; Yi, J. Improved chemical stability and cellular antioxidant activity of resveratrol in zein nanoparticle with bovine serum albumin-caffeic acid conjugate. *Food Chemistry* **2018**, *261*, 283-291.
16. Bharti, C.; Nagaich, U.; Pal, A. K.; Gulati, N. Mesoporous silica nanoparticles in target drug delivery system: A review. *International Journal of Pharmaceutical Investigation* **2015**, *5*(3), 124-133.
17. Gu, J.; Su, S.; Li, Y.; He, Q.; Shi, J. Hydrophilic mesoporous carbon nanoparticles as carriers for sustained release of hydrophobic anti-cancer drugs. *Chemical Communications* **2011**, *47*(7), 2101-2103.
18. Summerlin, N.; Qu, Z.; Pujara, N.; Sheng, Y.; Jambhrunkar, S.; McGuckin, M.; Popat, A. Colloidal mesoporous silica nanoparticles enhance the biological activity of resveratrol. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2016**, *144*, 1-7.

19. Fan, C.; Kong, F.; Shetti, D.; Zhang, B.; Yang, Y.; Wei, K. Resveratrol loaded oxidized mesoporous carbon nanoparticles: A promising tool to treat triple negative breast cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2019**, *519*(2), 378-384.
20. Jiang, F.; Chen, D.; Li, R.; Wang, Y.; Zhang, G.; Li, S.; Zheng, J.; Huang, N.; Gu, Y.; Wang, C. Eco-friendly synthesis of size-controllable amine-functionalized graphene quantum dots with antimycoplasma properties. *Nanoscale* **2013**, *5*(3), 1137-1142.
21. Wang, Y.; Kong, W.; Wang, L.; Zhang, J. Z.; Li, Y.; Liu, X.; Li, Y. Optimizing oxygen functional groups in graphene quantum dots for improved antioxidant mechanism. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2019**, *21*(3), 1336-1343.
22. El-Hnayn, R.; Canabady-Rochelle, L.; Desmarets, C.; Balan, L.; Rinnert, H.; Joubert, O.; Medjahdi, G.; Ben Ouada, H.; Schneider, R. One-step synthesis of diamine-functionalized graphene quantum dots from graphene oxide and their chelating and antioxidant activities. *Nanomaterials* **2020**, *10*(1), 104-121.
23. Kwon, W.; Rhee, S.-W. Facile synthesis of graphitic carbon quantum dots with size tunability and uniformity using reverse micelles. *Chemical Communications* **2012**, *48*(43), 5256-5258.
24. Zhou, X.; Ma, P.; Wang, A.; Yu, C.; Qian, T.; Wu, S.; Shen, J. Dopamine fluorescent sensors based on polypyrrole/graphene quantum dots core/shell hybrids. *Biosensors and Bioelectronics* **2015**, *64*, 404-410.
25. Durán, G. M.; Benavidez, T. E.; Contento, A. M.; Ríos, A.; García, C. D. Analysis of penicillamine using Cu-modified graphene quantum dots synthesized from uric acid as single precursor. *Journal of Pharmaceutical Analysis* **2017**, *7*(5), 324-331.
26. Balouch, A.; Kolachi, M.; Talpur, F. N.; Khan, H.; Bhangar, M. I. Sorption kinetics, isotherm and thermodynamic modeling of defluoridation of ground water using natural adsorbents. *American Journal of Analytical Chemistry* **2013**, *4*(5), 221-228.
27. Edet, U. A.; Ifelebuegu, A. O. Kinetics, isotherms, and thermodynamic modeling of the adsorption of phosphates from model wastewater using recycled brick waste. *Processes* **2020**, *8*(6), 665-679.

28. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* **1999**, *26*(9-10), 1231-1237.
29. Sun, Y.; Bi, Q.; Zhang, X.; Wang, L.; Zhang, X.; Dong, S.; Zhao, L. Graphene quantum dots as additives in capillary electrophoresis for separation cinnamic acid and its derivatives. *Analytical Biochemistry* **2016**, *500*, 38-44.
30. Beckers, J.; Everaerts, F.; Ackermans, M. Determination of absolute mobilities, pK values and separation numbers by capillary zone electrophoresis: Effective mobility as a parameter for screening. *Journal of Chromatography A* **1991**, *537*, 407-428.
31. Liu, Y.; Fan, Y.; Gao, L.; Zhang, Y.; Yi, J. Enhanced pH and thermal stability, solubility and antioxidant activity of resveratrol by nanocomplexation with α -lactalbumin. *Food and Function* **2018**, *9*(9), 4781-4790.
32. Pauluk, D.; Padilha, A. K.; Khalil, N. M.; Mainardes, R. M. Chitosan-coated zein nanoparticles for oral delivery of resveratrol: Formation, characterization, stability, mucoadhesive properties and antioxidant activity. *Food Hydrocolloids* **2019**, *94*, 411-417.
33. Tian, B.; Liu, J. Resveratrol: A review of plant sources, synthesis, stability, modification and food application. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2020**, *100*(4), 1392-1404.
34. Zupančič, Š.; Lavrič, Z.; Kristl, J. Stability and solubility of *trans*-resveratrol are strongly influenced by pH and temperature. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2015**, *93*, 196-204.
35. Li, Q.; Chen, B.; Xing, B. Aggregation kinetics and self-assembly mechanisms of graphene quantum dots in aqueous solutions: cooperative effects of pH and electrolytes. *Environmental Science and Technology* **2017**, *51*(3), 1364-1376.
36. Hyde, A. M.; Zultanski, S. L.; Waldman, J. H.; Zhong, Y. L.; Shevlin, M.; Peng, F. General principles and strategies for salting-out informed by the Hofmeister series. *Organic Process Research and Development* **2017**, *21*(9), 1355-1370.

37. Wang, S.; Cole, I. S.; Li, Q. The toxicity of graphene quantum dots. *RSC Advances* **2016**, *6*(92), 89867-89878.
38. Shang, W.; Zhang, X.; Zhang, M.; Fan, Z.; Sun, Y.; Han, M.; Fan, L. The uptake mechanism and biocompatibility of graphene quantum dots with human neural stem cells. *Nanoscale* **2014**, *6*(11), 5799-5806.
39. Shen, J.; Zhu, Y.; Yang, X.; Li, C. Graphene quantum dots: emergent nanolights for bioimaging, sensors, catalysis and photovoltaic devices. *Chemical Communications* **2012**, *48*(31), 3686-3699.
40. Tian, P.; Tang, L.; Teng, K.; Lau, S. Graphene quantum dots from chemistry to applications. *Materials Today Chemistry* **2018**, *10*, 221-258.
41. Bender, A. C.; Faulkner, J. A.; Tulimieri, K.; Boise, T. H.; Elkins, K. M. High Resolution Melt Assays to Detect and Identify *Vibrio parahaemolyticus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, and *Clostridioides difficile* Bacteria. *Microorganisms* **2020**, *8*(4), 561-570.
42. Nash, A. K.; Auchtung, T. A.; Wong, M. C.; Smith, D. P.; Gesell, J. R.; Ross, M. C.; Stewart, C. J.; Metcalf, G. A.; Muzny, D. M.; Gibbs, R. A. The gut mycobiome of the Human Microbiome Project healthy cohort. *Microbiome* **2017**, *5*(1), 1-13.
43. Luo, Y.; Wang, T. T.; Teng, Z.; Chen, P.; Sun, J.; Wang, Q. Encapsulation of indole-3-carbinol and 3, 3'-diindolylmethane in zein/carboxymethyl chitosan nanoparticles with controlled release property and improved stability. *Food Chemistry* **2013**, *139*(1-4), 224-230.

CONCLUSIONES

La Nanociencia y la Nanotecnología han experimentado desarrollos asombrosos desde sus inicios allá por los años ochenta, convirtiéndose en una de las áreas científico-técnicas de más rápido crecimiento en la actualidad. Podría decirse que la Nanociencia ya no está al margen de la ciencia ficticia y futurista, convirtiéndose en un campo competitivo de investigación, gracias a la disponibilidad de nuevos procedimientos de síntesis de estructuras nanométricas, así como al desarrollo de herramientas para su caracterización y mejor conocimiento de sus excepcionales propiedades. Sin embargo, desde una perspectiva industrial aún se encuentra lejos de los grandes logros que de ella se espera. El carácter transversal de la Nanociencia y Nanotecnología extiende su influencia a diversas áreas del conocimiento, entre las que por supuesto se encuentra la Química Analítica, la cual ha integrado con éxito los avances nanotecnológicos. En este sentido, para dar soluciones a las diversas limitaciones que presenta la Química Analítica clásica y con el fin de intentar instaurar el nanomundo a nivel industrial, se ha pretendido contribuir desarrollo a esta nueva disciplina, la Nanociencia y Nanotecnología Analítica.

A partir de las observaciones realizadas a lo largo del desarrollo de la presente Tesis Doctoral, se extraen diversas conclusiones fruto del trabajo experimental. Con carácter general, las investigaciones aquí descritas han contribuido al desarrollo y validación de nuevas metodologías analíticas, o la mejora de las ya existentes, que permiten incorporar herramientas nanométricas que permiten el control de forma sensible y selectiva de una gran variedad de analitos de interés alimentario. La incorporación de la Nanotecnología a los procesos permite abaratar costes, así como metodologías simplificadas y miniaturizadas más rápidas. Por otro lado, se han propuesto estrategias espectroscópicas que permiten el análisis cuantitativo de nanopartículas o nanomateriales de distinta naturaleza en muestras de carácter agroalimentario.

Las conclusiones esenciales de carácter específico que se pueden extraer como resultado de los objetivos alcanzados se pueden resumir en:

- Dadas las limitaciones que presenta el uso de moléculas bioactivas lipofílicas en la industria alimentaria como son su baja solubilidad acuosa,

biodisponibilidad reducida y sensibilidad al pH, se ha recurrido a la nanotecnología con el fin de encapsular un pigmento polifenólico natural en nanomicelas (nanocurcumina) cuyos componentes son GRAS (Generally Recognized as Safe) dado que su ámbito de aplicación es el alimentario, consiguiendo mejorar su solubilidad y, como consecuencia, su biodisponibilidad y actividad biológica.

- Se ha propuesto una metodología con detección fluorescente asistida por nanomateriales, concretamente puntos cuánticos de grafeno funcionalizados con grupos amino y carboxilo, como sonda sensora para el análisis de curcumina de forma sensible y selectiva mediante la inactivación de la señal fluorescente del nanomaterial. Este procedimiento, además, presenta la gran virtud de poder discriminar entre curcumina y nanocurcumina, sin destruir su conformación estructural original, en función de la invariabilidad o alteración en la longitud de onda máxima de emisión.
- La electroforesis capilar con detección UV-Vis ha permitido la separación y posterior cuantificación de siete compuestos bioactivos y algunos de sus derivados que generalmente aparecen de forma conjunta con los anteriores en muestras de alimentos y suplementos dietéticos. La novedad de esta investigación se centra en la utilización de un nanomaterial basado en carbono, concretamente puntos cuánticos de grafeno, funcionalizados con cavitandos ciclodextrina como aditivo en el electrolito de separación. Este hecho permitió aumentar considerablemente la selectividad del método y poder cuantificarlos con la sensibilidad suficiente para desarrollar un método analítico de multicomponentes bioactivos que podría ser muy valorado por laboratorios cuya actividad esté relacionada con el análisis de muestras de alimentos que contengan este tipo de compuestos. Los resultados obtenidos demostraron también la buena selectividad del método propuesto en una matriz correspondiente a una formulación comercial. El tipo de aditivo utilizado es plenamente soluble en disoluciones acuosas a diferencia de otros muchos nanomateriales de carbono, como el grafeno o los nanotubos de carbono, lo que contribuye a evitar el consumo de disolventes orgánicos tóxicos para su

solubilización, tal y como son requeridos en los procesos de separación tradicionales, contribuyendo así a una química más sostenible, o a la utilización de surfactantes que pueden producir alteraciones en los análisis dando lugar a una mayor irreproducibilidad de los mismos. En este punto cabe resaltar que, ante la baja solubilidad de la β -ciclodextrina en soluciones acuosas, en este estudio se ha empleado el derivado CM- β -ciclodextrina debido a que al metilar los grupos hidroxilo libres de las unidades de glucosa de su estructura se contribuye a incrementar considerablemente su solubilidad en agua.

- El método SERS desarrollado presenta un doble objetivo, por un lado, contribuir a la nanometrología analítica mediante la detección y cuantificación sensible de nanopartículas de oro de forma indirecta en diversas matrices de interés mediante la señal Raman de diferentes aditivos alimentarios. Por otro lado, las nanopartículas de oro de mayor tamaño de aquellas sintetizadas por una técnica de nucleación y crecimiento han servido como plataforma sensora idónea para la detección y cuantificación del colorante eritrosina de forma directa en matrices alimentarias. Además, empleando patrones de nanopartículas de oro se ha observado un comportamiento que indica que los parámetros experimentales de medida seleccionados pueden usarse como guía para estimar de forma rápida y sencilla el tamaño de partícula, en función de la magnificación de la intensidad que produzcan, lo cual podría ser usado por ejemplo para diseños experimentales de síntesis. El procedimiento general es simple, rápido y de bajo costo debido a la reducida cantidad de muestra a utilizar y baja concentración de nanomaterial, proporcionando una valiosa herramienta analítica en el campo de la seguridad y control alimentario.
- Otro quimiosensor dual para la determinación de óxido de grafeno y catequina es el desarrollado mediante señales fluorescentes utilizando un fluoróforo orgánico sostenible, la riboflavina (vitamina B₂). Previamente, se sintetizaron diferentes estructuras de óxido de grafeno de tamaño controlado las cuales han podido ser cuantificadas y diferenciadas en función de su afinidad con el fluoróforo, actuando como *quencher* en muestras ambientales. La nanoplataforma riboflavina-óxido de grafeno con el nanomaterial que produce

la respuesta más sensible, se ha podido cuantificar catequina de forma selectiva proporcionando resultados satisfactorios en muestras de alimentos.

- Se ha planteado una innovadora aplicación de los puntos cuánticos de grafeno, utilizados anteriormente, de síntesis sencilla y rápida para la fotoprotección del isómero biológicamente activo de uno de los polifenoles naturales más conocido, el resveratrol. La aplicación consiste en la adsorción de resveratrol sobre el nanomaterial de tal forma que confiere estabilidad fotoquímica al polifenol, produciendo una importante inhibición en la transformación isomérica de *trans*- en *cis*-resveratrol al ser irradiado con luz UV. Un método electroforético, previamente optimizado y validado, ha permitido la separación de los estereoisómeros de resveratrol y su control analítico para poder evaluar el efecto observado. El efecto de fotoestabilidad o fotoprotección que ejerce el nanomaterial al resveratrol fue evaluado en muestras comerciales tanto dopadas con el analito como en algunas que contienen el analito de manera endógena. En todas las muestras analizadas, suplementos dietéticos y bebidas, se ha observado una ralentización de la isomerización cuando el nanomaterial está presente. Dada la incertidumbre que puede ocasionar el incorporar un nanomaterial a un producto que va a ser ingerido, también se han realizado ensayos de toxicidad en microorganismos modelo en presencia de la concentración del nanomaterial que produce el máximo efecto de inhibición del proceso. Estos resultados revelaron la ausencia de efecto tóxico para estos microorganismos. Además, la principal propiedad beneficiosa para la salud del resveratrol, como de la mayoría de los polifenoles, es su actividad antioxidante la cual fue evaluada cuando el polifenol se encuentra protegido con el nanomaterial con satisfactorios resultados.

Conclusiones con más detalle han sido incluidas al final de la discusión de los resultados obtenidos en una de las investigaciones realizadas.

AUTOEVALUACIÓN CIENTÍFICA

La experiencia adquirida durante el desarrollo de las investigaciones científicas presentadas en esta Tesis Doctoral junto con la redacción de esta Memoria han aportado una visión general y objetiva del trabajo de investigación realizado. En esta sección se presenta un análisis crítico de los resultados obtenidos para, por un lado, valorar las principales aportaciones de los avances logrados desde un punto de vista científico y, por otro lado, poner de manifiesto las posibles limitaciones y carencias encontradas a lo largo del periodo experimental con vistas a planificar futuras investigaciones encaminadas a una mejora de los parámetros analíticos objeto de estudio.

En primer lugar, he de destacar la contribución de las investigaciones desarrolladas a la Nanometrología Analítica ya que comprende dos aspectos generales relacionados con los nanomateriales:

- Caracterización como muestras analíticas para un uso posterior de las mismas como herramienta, explotando las excepcionales propiedades de los nanomateriales para la mejora de metodologías analíticas o desarrollo de otras novedosas sensibles, selectivas y robustas en el ámbito alimentario las cuales no serían posibles sin la aproximación de la nanotecnología. Probablemente, hasta la fecha este sea el aspecto más abordado por la comunidad científica.
- Análisis de muestras agroalimentarias que contienen nanomateriales, los cuales son el objeto de estudio, para proporcionar sobre los mismos información cualitativa y cuantitativa de calidad. En este sentido, es importante desarrollar nuevas estrategias analíticas, así como instrumentación adecuada que permita evaluar el comportamiento que presentan las nanoestructuras en comparación con su contraparte a gran escala. El gran interés por el control del nanomundo reside en dar respuesta a los numerosos aspectos cruciales que están aún por resolver, principalmente sus niveles toxicológicos y como consecuencia el impacto que deban ocasionar sobre la salud humana, animal o sobre el medioambiente.

Sin embargo, además de las aportaciones mencionadas también se ha llevado a cabo una evaluación crítica en la que se han tenido en cuenta las carencias y

dificultades encontradas. Las principales limitaciones de la línea de investigación desarrollada se describen a continuación.

En cuanto a las investigaciones dedicadas a la utilización de nanomateriales como herramientas analíticas en la etapa de separación instrumental o detección, aunque no cabe duda su gran desempeño, es necesario perfeccionar la reproducibilidad entre las distintas síntesis. En este sentido, las nanoplataformas sensoras o los aditivos a escala nanométrica que se utilizan en los métodos de separación, incluso aquellos que pudiesen ser empleado como herramienta analítica en la etapa de preparación de la muestra están un paso por detrás de los convencionales, cuyas síntesis son altamente reproducibles.

Otra de las limitaciones encontradas reside en que los procedimientos analíticos que se proponen se han desarrollado en la modalidad “off-line” (fuera de línea), mientras en la Química Analítica actual cada vez son más demandadas las metodologías en la modalidad “on-line” (en línea) por las numerosas ventajas que presenta como es el mayor nivel de automatización, reducir el riesgo de contaminación de las muestras y acortar el tiempo de análisis, entre otras.

La incorporación de nanopartículas metálicas a la espectroscopía Raman, conocida como técnica SERS, ha demostrado ser una herramienta rápida, simple y sensible para la determinación de analitos de interés alimentario o de las propias nanopartículas como analito. A pesar de haber podido utilizar en el proceso de detección nanopartículas con diferente forma igual que se ha hecho con el tamaño con el fin de mejorar la sensibilidad, diferentes autores han demostrado una elevada irreproducibilidad de la medida que podría estar potenciada por partículas anisotrópicas. Por ello, se ha llegado a una situación de compromiso entre el tamaño y la forma de partícula. Por ejemplo, en una forma triangular o estrellada los vértices de la nanoestructura serían los puntos de máxima intensificación de la señal Raman, mientras que las demás zonas superficiales de la partícula producirían una intensificación menor. Por otro lado, el uso de un espectrómetro Raman confocal con detector de carga acoplada con multiplicador de electrones como el utilizado para la caracterización de las nanoestructuras de carbono permite mejorar la sensibilidad, incluso utilizando potencias de láser bajas. Una de las limitaciones en este aspecto ha

sido el uso de un solo tipo de láser, 785 nm, debido a que el Raman portátil utilizado no permite trabajar con más tipos de láser. Otra limitación es la interferencia de fluorescencia debido al uso de este láser, evitando obtener límites de detección más bajos. La automatización de la fabricación de los sustratos SERS mediante el procedimiento *spin coating* en lugar de *drop casting* podría ser un gran avance, tanto en para la rapidez de la preparación como para conseguir una mayor homogeneidad de estos. De cualquier forma, los resultados satisfactorios obtenidos en la metodología descrita en el Capítulo IV.1. pueden formar parte de una primera y prometedora aproximación a la cuantificación de nanomateriales y utilización de los mismos en la detección de otros analitos en muestras alimentarias utilizando simplemente un equipo un Raman portátil.

Con relación al estudio de nanopartículas o nanomateriales como objeto, actualmente se han producido grandes avances en la determinación directa o indirecta de aquellos de naturaleza inorgánica. Sin embargo, por cuestiones como las que se describe a continuación, aún es un desafío para los científicos la caracterización, cuantificación y discriminación de materiales orgánicos nanoestructurados:

- Ausencia de materiales de referencia que permitan emitir resultados con mayor fiabilidad y robustez dada la gran variedad de nanoformulaciones que existen, así como de componentes de grado alimentario para su fabricación. En ausencia de dichos materiales, la alternativa pasa por la realización de estudios interlaboratorio y la comparación de los resultados obtenidos con publicaciones ya descritas, aunque se debe resaltar que la bibliografía existente en este campo todavía es muy escasa.
- Necesidad de disponer de una legislación concisa acerca de estos nuevos nanomateriales y su uso en el sector alimentario. Por ejemplo, uno de los suplementos dietéticos utilizados para el desarrollo de la metodología propuesta en el Capítulo III.1 en el cual se indicaba solamente la presencia del bioactivo encapsulado en una nanoformulación micelar, se comprobó que parte de ese bioactivo se encontraba en su forma libre discrepando de la información que indicaba el fabricante en el producto. Además, el tamaño de

partícula en la matriz dietética se estudió por varias técnicas (DLS y cryo-SEM) resultando ser bastante inferior que el indicado por el fabricante.

- Implementación de nuevas metodologías analíticas e instrumentación avanzada que permita corroborar el cumplimiento de las normativas establecidas por la legislación. Es crucial disponer de métodos, instrumentos y herramientas que permitan extraer estos nanomateriales sin alterar su estado original, discriminar en el entorno en el que se encuentra el bioactivo, poder cuantificarlo y conocer su tamaño. Técnicas de separación en las que se utilice algún tipo de disolvente son incompatibles para el análisis de materiales orgánicos nanoestructurados puesto que se ha demostrado que provocan la destrucción de su naturaleza original, algo similar ocurre con las técnicas de caracterización en las que se requiera la muestra en estado sólido para su análisis. Por tanto, las técnicas de separación convencionales podrían ser útiles para poder cuantificar el bioactivo una vez destruida la nanoestructura, pero previamente sería necesario estudiar otros aspectos para no alterar su estado original. No obstante, técnicas ópticas como son las espectroscópicas, UV-Vis, fluorescencia o Raman, aportan información sobre si el compuesto se encuentra encapsulado sin destruirlo, debido a las diferencias espectrales con respecto al compuesto sin encapsular. Aun así, este tipo de técnicas requieren de otras muchas para una exhaustiva caracterización. Sería interesante desarrollar nuevas interfases que permitan acoplar técnicas ópticas que den información sobre el tamaño de partícula sin ser destructivas, como DLS, a técnicas de separación en las que se pueda cuantificar el bioactivo una vez fuera de la cápsula.

En definitiva, las oportunidades generadas por la Nanociencia y Nanotecnología en el campo del análisis agroalimentario son realmente prometedoras, pero, como ya ha ocurrido con otras disciplinas, el desarrollo de nuevas aplicaciones en ocasiones se produce a un ritmo más acelerado que el estudio de los efectos negativos derivados de las mismas. Por ejemplo, hoy en día, no quedan claros los efectos a largo plazo, ni siquiera existe consenso sobre si los hubiese, de la aplicación de los nanomateriales como herramientas en el análisis alimentario, su

persistencia en la matriz analizada o los factores que influyen en que los nanomateriales sean o no biodegradables. Desafortunadamente, no son suficientes los estudios relacionados con los riesgos derivados de la exposición laboral, y existe escasa regulación o métodos estandarizados para evaluar todos estos aspectos, disponiéndose tan solo para el material original.

El desafío actual es alcanzar un equilibrio paralelo entre la búsqueda de nuevas aplicaciones y una evaluación sistemática de sus efectos negativos tanto sobre los seres vivos como en el medio ambiente. Esta asignatura pendiente es, sin duda, la clave para la futura consolidación de la Nanociencia y Nanotecnología.

De cara a investigaciones futuras, además, se deberían tomar en consideración el desarrollo y aplicación de nuevas interfases entre la instrumentación clásica, que consigan mejorar la sensibilidad y cuantificar especies cuyo tamaño se encuentra en la escala nanométrica a nivel de traza en todo tipo de matrices. La instrumentación acoplada a detectores convencionales de la que se dispone comienza a no ser lo suficientemente efectiva para conseguir las metas propuestas en la actualidad al respecto de los nanomateriales, por lo cual es necesario responder a las necesidades del nanomundo dada la evidencia de su uso en minúsculas proporciones.

En general, pese a las grandes limitaciones que todavía existen y que deben ser superadas, la investigación científica realizada y los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral suponen un importante avance en este ámbito y están destinadas a proporcionar soluciones a algunos de los problemas que presenta la Química Analítica en el sector agroalimentario.

ANEXOS

Anexo I. Publicaciones y trabajos científicos de la Tesis Doctoral/ Publications and scientific works of the Doctoral Thesis

Discrimination between nanocurcumin and free curcumin using graphene quantum dots as a selective fluorescence probe

Esther Pinilla-Peñalver, M. Laura Soriano, Gema M, Durán, Eulogio J. Llorent-Martínez, Ana M. Contento, Ángel Ríos

Microchimica Acta **2020**, 187, 446-456

DOI: 10.1007/s00604-020-04437-x

Erythrosine B – coated gold nanoparticles as an analytical sensing tool for the proper determination of both compounds based on surface-enhanced Raman spectroscopy

Esther Pinilla-Peñalver, M. Jesús Villaseñor, Ana M. Contento, Ángel Ríos

Microchemical Journal **2020**, 157, 104937-104948

DOI: 10.1016/j.microc.2020.104937

Cyclodextrin-modified graphene quantum dots as a novel additive for the selective separation of bioactive compounds by capillary electrophoresis

Esther Pinilla-Peñalver, M. Laura Soriano, Ana M. Contento, Ángel Ríos

Microchimica Acta **2021**, 188, 440-451

DOI: 10.1007/s00604-021-05098-0

Graphene quantum dots an efficient nanomaterial for enhancing the photostability of *trans*-resveratrol in food samples

Esther Pinilla-Peñalver, Beatriz García-Béjar, Ana M. Contento, Ángel Ríos

Food Chemistry **2022**, 386, 132766-132776

DOI: 10.1016/j.foodchem.2022.132766

Development of a novel “turn-off-on” fluorescent (nano)sensor based on riboflavin emission for graphene oxide and catechin detection in fields of interest

Esther Pinilla-Peñalver, Adrián Esteban-Arranz, Ana M. Contento, Ángel Ríos

Enviado a la revista *ACS Journal Applied Materials and Interfaces*

Anexo II. Contribución de la Tesis Doctoral en eventos científicos/ Contribution of the Doctoral Thesis in scientific events

▪ **Comunicaciones orales/ Oral communications**

Simple and sensitive method for determining gold nanoparticles and food dyes using surface-enhanced Raman spectroscopy

Esther Pinilla-Peñalver, M. Jesús Villaseñor, Ana M. Contento, Ángel Ríos

XIII Young Science Symposium, Ciudad Real (Spain), June 2019

Graphene quantum dots in sensing: One step forward

M. Laura Soriano, Esther Pinilla-Peñalver, Ana M. Contento, Ángel Ríos

IX International Congress on Analytical Nanoscience and Nanotechnology (NyNA 2019), Zaragoza (Spain), July 2019

Surface-enhanced Raman spectroscopy for analytical applications (Award-winning communication)

Esther Pinilla-Peñalver

Researcher skills workdays, Ciudad Real (Spain), November 2019

Discrimination between nanocurcumin and free curcumin using graphene quantum dots as a selective fluorescence probe

Esther Pinilla-Peñalver, M. Laura Soriano, Ana M. Contento, Ángel Ríos

3rd International Conference of Materials and Environmental Sciences (ICMES 2019), Agadir (Morocco), December 2019

Speciation of a polyphenolic pigment in free solution and encapsulated into a nanocarrier system. Quantification of this bioactive in micellar medium in nutraceuticals

Esther Pinilla-Peñalver, M. Laura Soriano, Ana M. Contento, Ángel Ríos

XIV Young Science Symposium, Ciudad Real (Spain), July 2020

Resveratrol adsorption at graphene quantum dots surface: a promoting strategy to increase its photochemical stability in food products

Esther Pinilla-Peñalver, Ana M. Contento, Ángel Ríos

XV Young Science Symposium, Ciudad Real (Spain), July 2021

Riboflavin-based fluorescence as an efficient tool for graphene oxide and catechin sensing

Esther Pinilla-Peñalver, Adrián Esteban-Arranz, Ana M. Contento, Ángel Ríos

21st International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence & XIX International Symposium on Luminescence Spectrometry, Gijón (Spain), June 2022

Enhanced separation of seven biologically active compounds by capillary electrophoresis with carbon-based nanoparticles as additive

Esther Pinilla-Peñalver, M. Laura Soriano, Ana M. Contento, Ángel Ríos

XVI Young Science Symposium, Ciudad Real (Spain), June 2022

▪ **Comunicaciones póster/ Poster communications**

Metal nanoparticles as plasmonic sensors

Esther Pinilla-Peñalver, Manuel Bartolomé, Ana M. Contento, M. Jesús Villaseñor, Ángel Ríos

VIII Jornadas Doctorales de la Universidad de Castilla-La Mancha, Cuenca (Spain), October 2018

Versatile and sensitive surface-enhanced Raman spectroscopy for simultaneous determination of gold nanoparticles and erythrosine B in different samples

Esther Pinilla-Peñalver, M. Jesús Villaseñor, Ana M. Contento, Ángel Ríos

IX International Congress on Analytical Nanoscience and Nanotechnology (NyNA 2019), Zaragoza (Spain), July 2019

New role of graphene quantum dots: Recognition and quantification of curcumin when free and encapsulated into nano-sized micelles

Esther Pinilla-Peñalver, M. Laura Soriano, Ana M. Contento, Ángel Ríos

IX Jornadas Doctorales de la Universidad de Castilla-La Mancha, Ciudad Real (Spain), November 2019

Simple and versatile SERS method for determining gold nanoparticles and erythrosine in different samples

Esther Pinilla-Peñalver, M. Jesús Villaseñor, Ana M. Contento, Ángel Ríos

3rd International Conference of Materiales and Environmental Sciences (ICMES 2019), Agadir (Morocco), December 2019

β -Cyclodextrin-modified graphene quantum dots as a novel background electrolyte additive to increase selectivity in the detection of biologically active compounds

Esther Pinilla-Peñalver, M. Laura Soriano, Ana M. Contento, Ángel Ríos

XXXVIII Reunión Bienal de Química, Granada (Spain), June 2022

Nanoencapsulation a potential strategy for the delivery of bioactive compounds. Graphene quantum dots as a distinctive sensing nanotool for free and loaded curcumin in nanomicelles (Award-winning communication)

Esther Pinilla-Peñalver, M. Laura Soriano, Ana M. Contento, Ángel Ríos

I Reunión Científica del Grupo de Ciencia y Tecnologías (Bio)Analíticas, Granada (Spain), June 2022

Novel fluorescent strategy based on the competitive interactions between riboflavin and catechin for graphene oxide surface. Dual role of graphene oxide: analyte and analytical tool

Esther Pinilla-Peñalver, Adrián Esteban-Arranz, Ana M. Contento, Ángel Ríos

X International Congress on Analytical Nanoscience and Nanotechnology (NyNA 2022), Ciudad Real (Spain), September 2022

Photoprotective role of graphene quantum dots on the biologically active isomer of resveratrol in food models

Esther Pinilla-Peñalver, Beatriz García-Béjar, Ana M. Contento, Ángel Ríos

X International Congress on Analytical Nanoscience and Nanotechnology (NyNA 2022), Ciudad Real (Spain), September 2022

Anexo III. Curriculum Vitae

Esther Pinilla Peñalver

Graduada en Química

Toledo (España)

Esther.Pinilla@uclm.es

Formación académica

Doctorado en Química en el grupo de investigación Simplificación, Automatización, Miniaturización y Nanotecnología Analítica

Universidad de Castilla-La Mancha, 2018 – actualidad

Máster Universitario en Investigación en Química

Universidad de Castilla-La Mancha, 2016 – 2017

Máster en Gestión Avanzada de Laboratorios: Calidad, Medioambiente y Seguridad

Universidad de Castilla-La Mancha, 2015 – 2016

Especialista en Gestión de la Calidad en Laboratorios Químicos

Universidad de Castilla-La Mancha, 2015 – 2016

Grado en Química

Universidad de Castilla-La Mancha, 2011 – 2015

Experiencia profesional

Investigador en el grupo de Química Analítica Simplificación, Automatización, Miniaturización y Nanotecnología Analítica

Universidad de Castilla-La Mancha, 2018 – 2022

Investigador en el grupo de Química Organometálica y Catálisis Homogénea

Universidad de Castilla-La Mancha, 2014 – 2018

Químico-Analista de laboratorio

Laboratorios Valquer, Villaminaya, Toledo (España), 2014

Ayudas o contratos de investigación obtenidos

Contrato predoctoral para la formación de doctores (Formación de Personal Investigador, FPI) con referencia BES-2017-080357, asociado al Proyecto “CTQ2016-78793-P”

Entidad financiera: Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO)

Duración: desde 01/07/2018 hasta 30/09/2022

Participación en Proyectos de I+D+i financiados en convocatorias competitivas de administraciones o entidades públicas o privadas

Título del proyecto: **Metodologías analíticas basadas u orientadas a los nanomateriales en los campos ambiental, alimentario y bioanalítico**

Entidad financiadora: Ministerio de Economía y Competitividad (CTQ2016-78793-P)

Duración: desde 30/12/2016 hasta 29/12/2019

Investigadores responsables: Ángel Ríos Castro y Juana Rodríguez Flores

Título del proyecto: **Nanometrología analítica aplicada al campo alimentario**

Entidad financiadora: Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha (SBPLY/17/180501/000262)

Duración: desde 01/09/2018 hasta 31/08/2021

Investigadores responsables: Ángel Ríos Castro y Mohammed Zougagh Zariouh

Título del proyecto: **Plataformas multifuncionales de puntos cuánticos de grafeno para finalidades analíticas orientadas a resolver problemas ambientales y biomédicos**

Entidad financiadora: Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha y Fondos FEDER (SBPLY/17/180501/000333)

Duración: desde 15/09/2018 hasta 14/12/2020

Investigador responsable: M. Laura Soriano Dotor

Título del proyecto: **Contribuciones de la nanociencia y la nanotecnología analítica para la resolución de problemas en los campos alimentario, medioambiental y bioanalítico**

Entidad financiadora: Ministerio de Economía y Competitividad (PID2019-104381GB-I00)

Duración: desde 01/06/2020 hasta 30/05/2023

Investigador responsable: Ángel Ríos Castro

Producción científica

Publicaciones

Título: **Graphene quantum dots as an efficient nanomaterial for enhancing the photostability of *trans*-resveratrol in food samples**

Autores: Esther Pinilla-Peñalver, Beatriz García-Béjar, Ana M. Contento, Ángel Ríos

Revista: Food Chemistry 2022, 386, 132766-132776

Título: **Cyclodextrin-modified graphene quantum dots as a novel additive for the selective separation of bioactive compounds by capillary electrophoresis**

Autores: Esther Pinilla-Peñalver, M. Laura Soriano, Ana M. Contento, Ángel Ríos

Revista: Microchimica Acta, 2021, 188, 440-451

Título: **Discrimination between nanocurcumin and free curcumin using graphene quantum dots as a selective fluorescence probe**

Autores: Esther Pinilla-Peñalver, M. Laura Soriano, Gema M, Durán, Eulogio J. Llorent-Martínez, Ana M. Contento, Ángel Ríos

Revista: Microchimica Acta, 2020, 187, 446-456

Título: **Erythrosine B – coated gold nanoparticles as an analytical sensing tool for the proper determination of both compounds based on surface-enhanced Raman spectroscopy**

Autores: Esther Pinilla-Peñalver, M. Jesús Villaseñor, Ana M. Contento, Ángel Ríos

Revista: Microchemical Journal, 2020, 157, 104937-104948

Título: Influence of the counterion on the synthesis of cyclic carbonates catalyzed by bifunctional aluminum complexes

Autores: Javier Martínez, Felipe de la Cruz-Martínez, Miguel A. Gaona, Esther Pinilla-Peñalver, Juan Fernández-Baeza, Ana M. Rodríguez, José A. Castro-Osma, Antonio Otero, Agustín Lara-Sánchez

Revista: Inorganic Chemistry, 2019, 58(5), 3396-3408

Título: Development of a novel “turn-off-on” fluorescent (nano)sensor based on riboflavin emission for graphene oxide and catechin detection in fields of interest

Autores: Esther Pinilla-Peñalver, Adrián Esteban-Arranz, Ana M. Contento, Ángel Ríos

Enviado a la revista: ACS Journal Applied Materials and Interfaces

Comunicaciones presentadas en congresos nacionales o internacionales

Título: Metal nanoparticles as plasmonic sensors

Autores: Esther Pinilla-Peñalver, Manuel Bartolomé, Ana M. Contento, M. Jesús Villaseñor, Ángel Ríos

Tipo de participación: Póster

Evento: VIII Jornadas Doctorales de la Universidad de Castilla-La Mancha, Cuenca (España), Octubre 2018

Título: Simple and sensitive method for determining gold nanoparticles and food dyes using surface-enhanced Raman spectroscopy

Autores: Esther Pinilla-Peñalver, M. Jesús Villaseñor, Ana M. Contento, Ángel Ríos

Tipo de participación: Comunicación oral

Evento: XIII Young Science Symposium, Ciudad Real (España), Junio 2019

Título: Graphene quantum dots in sensing: One step forward

Autores: M. Laura Soriano, Esther Pinilla-Peñalver, Ana M. Contento, Ángel Ríos

Tipo de participación: Comunicación oral

Evento: IX International Congress on Analytical Nanoscience and Nanotechnology (NyNA 2019), Zaragoza (Spain), July 2019

Título: Versatile and sensitive surface-enhanced Raman spectroscopy for simultaneous determination of gold nanoparticles and erythrosine B in different samples

Autores: Esther Pinilla-Peñalver, M. Jesús Villaseñor, Ana M. Contento, Ángel Ríos

Tipo de participación: Póster

Evento: IX International Congress on Analytical Nanoscience and Nanotechnology (NyNA 2019), Zaragoza (España), Julio 2019

Título: New role of graphene quantum dots: Recognition and quantification of curcumin when free and encapsulated into nano-sized micelles

Autores: Esther Pinilla-Peñalver, M. Laura Soriano, Ana M. Contento, Ángel Ríos

Tipo de participación: Póster

Evento: IX Jornadas Doctorales de la Universidad de Castilla-La Mancha, Ciudad Real (España), Noviembre 2019

Título: Surface-enhanced Raman spectroscopy for analytical applications (Award-winning communication)

Autor: Esther Pinilla-Peñalver

Tipo de participación: Comunicación oral

Evento: Researcher skills workdays, Ciudad Real (España), Noviembre 2019

Título: Simple and versatile SERS method for determining gold nanoparticles and erythrosine in different samples

Autores: Esther Pinilla-Peñalver, M. Jesús Villaseñor, Ana M. Contento, Ángel Ríos

Tipo de participación: Póster

Evento: 3rd International Conference of Materials and Environmental Sciences (ICMES 2019), Agadir (Marruecos), Diciembre 2019

Título: Discrimination between nanocurcumin and free curcumin using graphene quantum dots as a selective fluorescence probe

Autores: Esther Pinilla-Peñalver, M. Laura Soriano, Ana M. Contento, Ángel Ríos

Tipo de participación: Comunicación oral

Evento: 3rd International Conference of Materials and Environmental Sciences (ICMES 2019), Agadir (Marruecos), Diciembre 2019

Título: Speciation of a polyphenolic pigment in free solution and encapsulated into a nanocarrier system. Quantification of this bioactive in micellar medium in nutraceuticals

Autores: Esther Pinilla-Peñalver, Ana M. Contento, Ángel Ríos

Tipo de participación: Comunicación oral

Evento: XIV Young Science Symposium, Ciudad Real (España), Julio 2020

Título: Resveratrol adsorption at graphene quantum dots surface: a promoting strategy to increase its photochemical stability in food products

Autores: Esther Pinilla-Peñalver, Ana M. Contento, Ángel Ríos

Tipo de participación: Comunicación flash

Evento: XV Young Science Symposium, Ciudad Real (España), Julio 2021

Título: Riboflavin-based fluorescence as an efficient tool for graphene oxide and catechin sensing

Autores: Esther Pinilla-Peñalver, Adrián Esteban-Arranz, Ana M. Contento, Ángel Ríos

Tipo de participación: Comunicación oral

Evento: 21st International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence & XIX International Symposium on Luminescence Spectrometry, Gijón (España), Junio 2022

Título: Enhanced separation of seven biologically active compounds by capillary electrophoresis with carbon-based nanoparticles as additive

Autores: Esther Pinilla-Peñalver, M. Laura Soriano, Ana M. Contento, Ángel Ríos

Tipo de participación: Comunicación flash

Evento: XVI Young Science Symposium, Ciudad Real (España), Junio 2022

Título: β -Cyclodextrin-modified graphene quantum dots as a novel background electrolyte additive to increase selectivity in the detection of biologically active compounds

Autores: Esther Pinilla-Peñalver, M. Laura Soriano, Ana M. Contento, Ángel Ríos

Tipo de participación: Póster speech

Evento: XXXVIII Reunión Bienal de Química, Granada (España), Junio 2022

Título: Nanoencapsulation a potential strategy for the delivery of bioactive compounds. Graphene quantum dots as a distinctive sensing nanotool for free and loaded curcumin in nanomicelles (Award-winning communication)

Autores: Esther Pinilla-Peñalver, M. Laura Soriano, Ana M. Contento, Ángel Ríos

Tipo de participación: Póster

Evento: I Reunión Científica del Grupo de Ciencia y Tecnologías (Bio)Analíticas, Granada (España), Junio 2022

Título: Novel fluorescent strategy based on the competitive interactions between riboflavin and catechin for graphene oxide surface. Dual role of graphene oxide: analyte and analytical tool

Autores: Esther Pinilla-Peñalver, Adrián Esteban-Arranz, Ana M. Contento, Ángel Ríos

Tipo de participación: Póster

Evento: X International Congress on Analytical Nanoscience and Nanotechnology (NyNA 2022), Ciudad Real (España), Septiembre 2022

Título: Photoprotective role of graphene quantum dots on the biologically active isomer of resveratrol in food models

Autores: Esther Pinilla-Peñalver, Beatriz García-Béjar, Ana M. Contento, Ángel Ríos

Tipo de participación: Póster

Evento: X International Congress on Analytical Nanoscience and Nanotechnology (NyNA 2022), Ciudad Real (España), Septiembre 2022

Formación especializada

Título: **Ciclo de webinars Red Nacional de Sensores y Biosensores Ópticos**

Entidad organizadora: Red Nacional de Sensores y Biosensores Ópticos

Fecha: Enero – Junio, 2021

Lugar: On-line

Título: **Conoce la computación cuántica y sus aplicaciones**

Entidad organizadora: Universidad Castilla-La Mancha

Duración: 4h

Fecha: Marzo, 2021

Lugar: On-line

Título: **El arte y ciencia de las presentaciones**

Entidad organizadora: Universidad Castilla-La Mancha

Duración: 16h

Fecha: Enero, 2021

Lugar: On-line

Título: **Taller cromatografía de gases**

Entidad organizadora: DCA Chromatography

Duración: 3h

Fecha: Noviembre, 2020

Lugar: Ciudad Real, España

Título: **Curso Gestión de residuos peligrosos**

Entidad organizadora: Universidad Castilla-La Mancha

Duración: 10h

Fecha: Marzo, 2020

Lugar: On-line

Título: **Fundamentos y aplicaciones de la digestión ácida por microondas con el sistema Ethos**

Entidad organizadora: Metrohm Hispania

Duración: 3h

Fecha: Febrero, 2020

Lugar: Ciudad Real, España

Título: **Actividad formativa transversal: Curso corto de gestión de la I+D+i**

Entidad organizadora: Programa Doctorado Química – Universidad de Castilla-La Mancha

Fecha: Octubre – Diciembre, 2019

Lugar: Ciudad Real, España

Título: Actividad formativa transversal: Destrezas del investigador

Entidad organizadora: Programa Doctorado Química Química – Universidad de Castilla-La Mancha

Fecha: Noviembre, 2019

Lugar: Ciudad Real, España

Título: Curso Herramientas analíticas para la caracterización y aplicaciones de nanopartículas

Entidad organizadora: Instituto de Nanociencia de Aragón Duración: 16h

Fecha: Julio, 2019

Lugar: Zaragoza, España

Título: Curso Técnicas Instrumentales

Entidad organizadora: Instituto Regional Investigación Científica Aplicada

Duración: 8h

Fecha: Julio, 2019

Lugar: Ciudad Real, España

Título: Taller High Performance Liquid Chromatography

Entidad organizadora: Agilent Technologies

Duración: 4h

Fecha: Junio, 2019

Lugar: Ciudad Real, España

Título: Curso Prevención de Riesgos Laborales

Entidad organizadora: Universidad de Castilla-La Mancha

Duración: 50h

Fecha: Noviembre, 2018 – Enero, 2019

Lugar: On-line

Título: Curso “¿Cómo escribir un artículo científico en inglés?”

Entidad organizadora: Casa d'Estudis El Pont

Duración: 20h

Fecha: Septiembre – Octubre, 2018

Lugar: On-line

Título: Curso Formación teórica y práctica en el manejo de un espectrómetro de masas con plasma acoplado inductivamente “ICP-MS modelo Agilent 7900x acoplado a técnicas de separación de electroforesis capilar y cromatografía líquida de alta precisión”

Entidad organizadora: Agilent Technologies

Duración: 16h

Fecha: Abril, 2018

Lugar: Ciudad Real, Spain

Título: Estancias inmersión lengua inglesa

Entidad organizadora: Universidad Internacional Menéndez Pelayo

Duración: 160 h

Fecha: Agosto, 2014

Lugar: Valencia, Spain

Otra actividad académica relevante

Comité Organizador Congreso: X International School on Organometallic Chemistry “Marcial Moreno Mañas”

Fecha: Julio, 2017

Lugar: Universidad de Castilla-La Mancha, Ciudad Real, España

Co-direction of an end-of-degree Project entitled: “Carbon-based nanoparticles used as fluorescent sensors in chemistry”.

Fecha: Curso académico 2019 – 2020

Lugar: Universidad de Castilla-La Mancha, Ciudad Real, España

Comité Científico y Organizador Congreso: XV Young Science Symposium

Fecha: Julio, 2021

Lugar: Universidad de Castilla-La Mancha, Ciudad Real, España

Colaboración docente en el Área de Química Analítica del grado en Química e Ingeniería Industrial, Mecánica y Electrónica

Duración: 180h (18 créditos ECTS)

Fecha: Noviembre, 2018 – Febrero, 2022

Lugar: Universidad de Castilla-La Mancha, Ciudad Real, España

Miembro de asociaciones científicas

Real Sociedad de Química Española (RSEQ). Promotora de divulgación del grupo especializado en Ciencia y Tecnología (Bio)Analíticas (CTbA)

Sociedad de Espectroscopía Aplicada (SEA)

