

## Capítulo 2

# NANOTECNOLOGÍA EN QUÍMICA ANALÍTICA

Pablo Carrero\* y Maribel Valero

Laboratorio de Espectroscopia Molecular (LEM), Departamento de Química,  
Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

## CONTENIDO

<b>2.1. Introducción .....</b>	<b>31</b>
<b>2.2. Límites y campo de acción de la nanotecnología analítica .....</b>	<b>32</b>
<b>2.3. Nanosistemas analíticos .....</b>	<b>33</b>
2.3.1 <i>Sistemas analíticos manométricos</i>	
2.3.2 <i>Sistemas analíticos nanotecnológicos</i>	
2.3.3 <i>Nanosistemas analíticos</i>	
<b>2.4. Incorporación de los nanomateriales en los procesos analíticos .....</b>	<b>40</b>
2.4.1. <i>Rol de los nanomateriales orgánicos en el proceso analítico</i>	
2.4.1.1. <i>Nanomateriales a base de carbono</i>	
- <i>Nanotubos de carbono</i>	
- <i>Grafeno</i>	
- <i>Fullerenos</i>	
2.4.1.2. <i>Polímeros de impresión molecular.</i>	
- <i>Extracción en fase sólida-molecularmente impresa</i>	
- <i>Microextracción en fase sólida-molecularmente impresa</i>	
2.4.2. <i>Rol de los nanomateriales inorgánicos en el proceso analítico</i>	
2.4.2.1. <i>Nanopartículas metálicas en el proceso analítico.</i>	
- <i>Nanopartículas de metales.</i>	
- <i>Nanopartículas de óxidos metálicos.</i>	
- <i>Puntos cuánticos</i>	
<b>Referencias .....</b>	<b>65</b>

---

\* pcarrero@ula.ve



## 2.1. Introducción

La nanotecnología es un campo multidisciplinario asociado al estudio y desarrollo de sistemas en escala nanométrica, entre 1 y 100 nm. En esta escala, se observan propiedades y fenómenos totalmente nuevos que se rigen bajo las leyes de la mecánica cuántica; y son las que se aprovechan para crear nuevos materiales (nanomateriales, NMs) y dispositivos nanotecnológicos. La ciencia analítica está fuertemente implicada en el desarrollo y aplicación de los NMs, convirtiéndose en una de las áreas de investigación más importantes e innovadoras dentro de este ámbito. Nanotecnología analítica, nanoanálisis y nanoanalítica son términos que suelen ser utilizados en la literatura para referirse al desarrollo y uso de NMs en relación con la ciencia analítica. El nanoanálisis tiene dos principales direcciones o campos de acción.

El primero es el que se refiere a los métodos, procedimientos y/o técnicas utilizados para el análisis y estudio propiamente dicho de los MNs. Entre estos se destacan la microscopía de sonda de barrido (llamada SPM por las siglas en inglés para *Scanning Probe Microscopy*) que incluye la microscopía de fuerza atómica y la microscopía de efecto túnel. No menos importantes son las microscopías electrónicas de barrido y de transmisión, aunque las mismas ofrecen menor resolución que la SPM. Otras técnicas analíticas usadas en la ciencia de superficies y en la ciencia de materiales como son la espectroscopia electrónica Auger, la espectroscopia foto-electrónica de rayos-X, la espectroscopia óptica en las regiones ultravioleta y visible, la difracción de electrones de baja energía (LEED, de las siglas en inglés para *Low Energy Electron Diffraction*), la difracción de electrones reflejados de alta energía (RHEED, por las siglas en inglés para *Reflection High-Energy Electron Diffraction*), la espectrometría de rayos-X y la difracción de rayos-X, se utilizan ampliamente en el análisis de NMs.

Es común escuchar que la evolución de la nanociencia y la nanotecnología fueron de la mano del desarrollo de la respectiva técnica de análisis. Sin embargo, los químicos analíticos raramente se involucran en este primer campo de acción del nanoanálisis. El mismo está reservado fundamentalmente para los investigadores en las ciencias de los materiales, químicos inorgánicos, nano-biotecnólogos y los físicos. La tendencia inicial en este campo es utilizar alguna de las técnicas analíticas anteriormente mencionadas para el análisis cuantitativo de los NMs y el reconocimiento de átomos individuales sobre la superficie de los mismos, lo cual es posible gracias a la alta resolución de algunos de estos métodos. Por otro lado, existe la tendencia a combinar varias funciones en un mismo instrumento, lo cual no solo permite determinar la composición química de los NMs, sino su morfología. Por ejemplo, la identificación química a escala nanométrica y el mapeado de materiales ahora es posible con nano FTIR, una técnica que combina la microscopía óptica de barrido de campo cercano con la espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier. Iluminando la punta metalizada de un microscopio de fuerza atómica con un láser infrarrojo y analizando la luz de retorno con un espectrómetro de transformada de Fourier especialmente diseñado, los investigadores pueden mostrar una espectroscopia local infrarroja con una resolución espacial inferior a 20 nm.

El segundo campo de acción del nanoanálisis está mucho más relacionado con la química

analítica que con otras áreas del conocimiento. El mismo se refiere a la incorporación de los NMs o nanoestructuras en los procesos analíticos propiamente dichos, para el desarrollo de nuevos métodos analíticos, así como para mejorar otros ya existentes, logrando aplicaciones sorprendentemente sensibles y selectivas. Un gran número de trabajos han sido llevados a cabo en esta dirección utilizando diferentes técnicas analíticas, mayoritariamente espectroscópicas y electroquímicas, incorporando para ello diversos tipos de NMs. Existen varios criterios para clasificar sistemáticamente los NMs utilizados en el desarrollo de métodos analíticos: dimensionales, naturaleza química, homogeneidad y/o rigen. Sin embargo, podemos agruparlos de acuerdo a la similitud de su naturaleza química de la siguiente manera: a) NMs a base de carbono: fullerenos, grafeno, nanotubos y los nanopuntos de carbono; b) NMs basados en metales, dentro de los que se incluyen las nanopartículas (NPs) metálicas (oro, plata, etc.), de óxidos metálicos y los puntos cuánticos; c) nanopolímeros: los dendrímeros y los polímeros de impresión molecular (MIPs, siglas en inglés para *Molecular Imprinted Polymers*); d) NPs basadas en silicio; y e) las nanomicelas y nanovesículas.

Tan diversas como los NMs señalados anteriormente, son las líneas de investigación que en el área de la nanoanalítica podemos encontrar. Encabezan en la literatura los trabajos relacionados con el uso de NPs (por ejemplo, nanotubos, NPs metálicas y puntos cuánticos). Las NPs de oro y plata son usadas en espectroscopia óptica (absorción, fluorescencia y dispersión) y en la detección electroquímica de biomoléculas, incluyendo el ADN. Los nanotubos de carbono (CNTs, siglas en inglés para *Carbon NanoTubes*) se emplean ampliamente como materiales adsorbentes y en la construcción de electrodos nanoestructurados en métodos electroquímicos de análisis. Los puntos cuánticos (CdS, CdSe, CdTe, ZnSe, etc.) forman sistemas conjugados con los bioanalitos, por medio de los cuales los bioanalitos pueden ser detectados y determinados, especialmente utilizando la espectrometría de luminiscencia. Este método se caracteriza por un rendimiento cuántico muy alto de la luminiscencia y bandas espectrales relativamente estrechas. Los MIPs y las NPs de sílice se utilizan como adsorbentes selectivos, membranas y como elementos de detección. La cromatografía electrocinética micelar y la extracción micelar sin solventes orgánicos también son métodos bien desarrollados. Las nanomicelas y otros materiales similares también han sido utilizados como reactores químicos en aplicaciones fotométricas y luminiscentes.

En el presente capítulo se aborda fundamentalmente la clasificación y descripción de los sistemas nanoanalíticos, así como el papel que desempeñan los NMs en cada una de las etapas del proceso analítico (principalmente en las etapas de preparación de muestras, separación y detección de analitos). En cada caso se incluye una breve descripción de los NMs utilizados y ejemplos particulares de la aplicación de los mismos para el desarrollo de metodologías de análisis novedosas, altamente sensibles y selectivas.

## 2.2. Límites y campo de acción de la nanotecnología analítica

El prefijo “nano” ha sido utilizado ampliamente en la literatura y en muchos casos ha sido utilizado de manera exagerada, lo cual pudiera deberse al gran impacto que tiene en nuestros días la nanotecnología. Para el mes de mayo del año 2015, de acuerdo con el motor de búsqueda científico “*Scopus*” se habían publicado alrededor de 1.112.000 trabajos con el

prefijo “nano” asociado al título, resumen o palabras claves de los mismos. De igual manera se habían publicado 104.278 trabajos asociados con el término nanotecnología, 3.866 trabajos asociados con el término nanoanálisis (del inglés, *nano-analysis*) y 51 trabajos asociados con el término nanoanalítica (del inglés, *nano-analytical*). De acuerdo con el profesor Miguel Valcárcel<sup>1</sup>, de la Universidad de Córdoba, España, el prefijo “nano” en relación con la nanotecnología sólo debe utilizarse en conexión con aquellos NMs, nanoestructuras y nanodispositivos que explotan no sólo sus dimensiones nanométricas, sino también las excepcionales propiedades ópticas, eléctricas, térmicas y magnéticas del nanomundo, que constituyen la base real para la presente revolución tecnológica. En este orden de ideas no se puede cubrir bajo la sombrilla de la nanotecnología la electroforesis capilar (EC) por el solo hecho de manejar volúmenes de muestra en el orden de los nanolitros.

### 2.3. Nanosistemas analíticos

Una definición netamente ideal de nanosistema analítico es aquella que lo delimita como un instrumento y/o dispositivo que posee dimensiones nanométricas y que interactúa fundamentalmente con base en las propiedades fisicoquímicas de la nanociencia<sup>1</sup>. Se considera esta definición como ideal, ya que es necesario contar además con micro y macro componentes que conecten el nanomundo con el macro-mundo para hacer viable la construcción y utilización de los nanosistemas. Por lo tanto, los nanosistemas analíticos pueden ser definidos de una manera más realista como instrumentos y/o dispositivos que tienen propiedades fisicoquímicas a nanoescala (*sistemas analíticos nanométricos*)<sup>1,2</sup> o instrumentos y/o dispositivos que incorporan componentes con dimensiones nanométricas (*sistemas analíticos nanotecnológicos*)<sup>1,2</sup>. Se pueden diseñar y construir dispositivos llamados apropiadamente *nanosistemas analíticos* que integran con éxito los dos tipos de sistemas anteriormente señalados, es decir, incorporando NMs y explotando las propiedades del tamaño nanométrico (por ejemplo CNTs individuales para uso como electrodos y sistemas supramoleculares que reconocen selectivamente un analito)<sup>2</sup>. Los escenarios anteriormente expuestos se pueden esquematizar tal y como se muestra en la figura 2.1.



**Fig. 2.1:** Los tres diferentes escenarios para los nanosistemas analíticos: (1) escenario ideal, (2) sistemas analíticos con dimensiones nanométricas, (3) sistemas analíticos nanotecnológicos.

### 2.3.1. Sistemas analíticos nanométricos

Los sistemas analíticos nanométricos (figura 2.1, cuadro de texto 2) están fundamentalmente basados en el tamaño de la muestra a analizar o en el flujo de los fluidos involucrados en el análisis, los cuales se ajustan al rango de nanómetros y nanolitros por minuto (nL/min), respectivamente. Un buen ejemplo de un dispositivo nanométrico lo constituye un sistema de nanocromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (nano-LC/MS)<sup>3</sup>, desarrollado en los laboratorios Agilent, en el que la velocidad de flujo es de unos cientos nL/min. Usualmente, los sistemas de nano-LC/MS requieren de una columna de preconcentración, una columna de separación, una punta de nanopulverización y los accesorios necesarios para conectar estas partes entre sí. El microdispositivo fabricado por Agilent<sup>3</sup> integra estos componentes en un solo chip, eliminando la necesidad de conexiones convencionales utilizadas en LC. El chip fue fabricado mediante laminación de películas de poliimida con canales hechos mediante ablación láser. Las columnas de preconcentración y de separación fueron empacadas utilizando partículas de cromatografía de fase inversa convencionales. Una válvula rotativa sellada permite conmutar entre las configuraciones de carga y de separación, con volúmenes muertos y tiempos de retardo mínimos, admitiendo la operación a alta presión. El conjunto del chip para LC y la válvula se monta dentro de la cámara de ionización por electro-pulverización (ESI, del inglés *Electro-Spray Ionization*) de un espectrómetro de masas de trampa de iones. La eficiencia global del sistema se demostró a través de la separación en fase inversa de un digerido de proteínas a velocidades de flujo entre 100 y 400 nL/min.

Un segundo ejemplo de un sistema nanométrico, lo constituye una estrategia desarrollada para el monitoreo en línea mediante espectroscopia Raman de reacciones químicas en nanogotas levitadas mediante ultrasonido<sup>4</sup>. Para esto se utiliza un microdispensador de flujo conectado a un sistema de inyección de flujo automático, a través del cual se dosifican gotitas con volumen en el orden de los picolitros (pL) hacia el nodo de una trampa ultrasónica. El microdispensador permite que una secuencia bien definida de reactivos sea inyectada dentro de la nanogota que levita colocada en el foco de recolección óptica de un espectrómetro Raman de transformada de Fourier. De esta manera, las reacciones químicas pueden llevarse a cabo y supervisarse en línea.

Aunque los sistemas nanométricos proporcionan, sin duda, ventajas (por ejemplo, en el análisis de nuevas matrices en las que la cantidad de muestra es crítica), los mismos no pueden ser identificados con la verdadera nanotecnología porque en estos no hay un control propiamente dicho sobre las interacciones moleculares o atómicas.

### 2.3.2. Sistemas analíticos nanotecnológicos

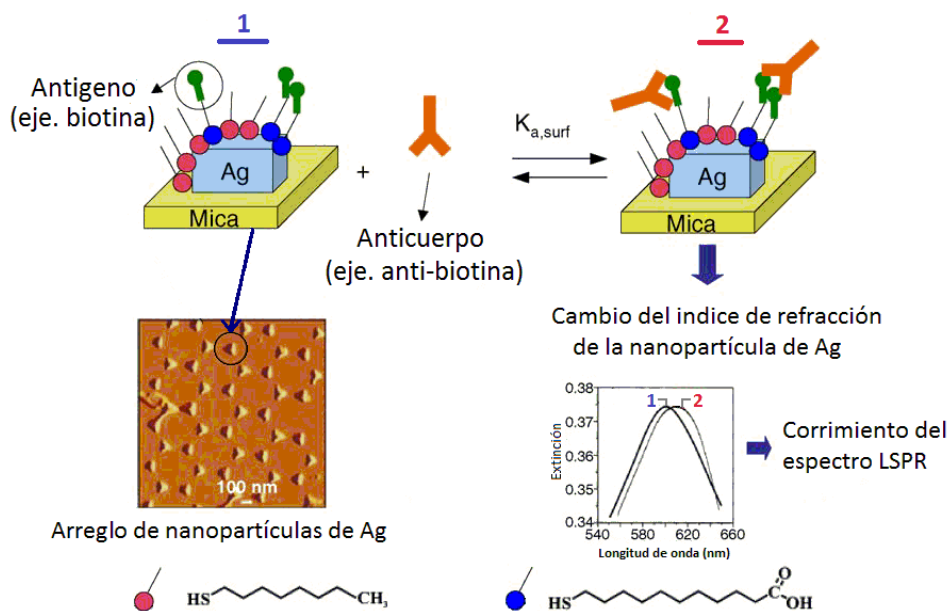
Los sistemas analíticos nanotecnológicos son instrumentos y/o dispositivos que incorporan componentes de tamaño nanométrico los cuales basan su funcionamiento en los principios de la nanociencia, pero que usualmente poseen dimensiones micrométricas y por lo tanto suelen ser adicionalmente denominados como *microsistemas que integran nanotecnología* (figura 2.1, cuadro de texto 3). A menudo es difícil distinguir con precisión entre microsistemas y nanosistemas por el hecho de que un gran número de microsistemas integran nanotecnología de alguna manera. Muy a menudo el microcomponente actúa como un

puente entre el mundo macro (que se desea estudiar) y el mundo nano (el dominio real de la nanotecnología). Los sistemas nanotecnológicos representan una buena parte de las aplicaciones de la nanotecnología en la química analítica y están disponibles en una gran variedad de diseños y aplicaciones. Se destacan dentro de este grupo los nanosensores<sup>5-16</sup>, nanoelectrodos<sup>17,18</sup> y las nanosondas<sup>19</sup>.

Para referirnos brevemente a los tipos de nanosensores desarrollados hasta la fecha debemos señalar que los mismos pueden ser clasificados dependiendo de la propiedad monitoreada, aunque se prefiere sistematizar los mismos dependiendo del tipo de NMs utilizado para su desarrollo<sup>5</sup>. Así pues, podemos distinguir sensores basados en NPs<sup>7,8</sup> y nanocúmulos<sup>5</sup> (del inglés *nano-clusters*), sensores basados en nanotubos<sup>9,10</sup> y nanoalambres<sup>11</sup>, sensores de silicio poroso<sup>12</sup>, sensores nanomecánicos<sup>13,14</sup>, nanoarreglos de receptor-ligando<sup>15</sup> y nanoestructuras autoensambladas<sup>16</sup>.

Un primer ejemplo de un sensor nanotecnológico lo representa el caso de un prototipo de biosensor óptico a nanoescala, para la realización de inmuno-ensayos en tiempo real<sup>8</sup>. En este dispositivo se utiliza el corrimiento de la longitud de onda del máximo de extinción ( $\lambda_{\text{max}}$ ) del espectro de Resonancia de Plasmones Superficiales Localizados (LSPR, por las siglas en inglés para *Localized Surface Plasmon Resonance*), de NPs triangulares de plata, para demostrar la interacción entre un antígeno (biotina) y un anticuerpo (anti-biotina). La LSPR es responsable del color brillante mostrado por las NPs metálicas utilizadas desde tiempos ancestrales para dar brillo a los cristales utilizados en la construcción de los vitrales de las catedrales. El espectro LSPR depende no solo de la nanopartícula misma (es decir, su tamaño, material y forma) sino también de las propiedades de su ambiente exterior<sup>5,7</sup>. Esto hace que las NPs de los metales nobles sean extremadamente valiosas para la construcción de nanosensores. Los espectros LSPR son altamente sensibles a los cambios del índice de refracción local, el cual, en el caso de las NPs, cambia cuando existen moléculas unidas a su superficie. Esto produce un cambio en el espectro de LSPR que puede ser utilizado para la detección selectiva de moléculas unidas a las NPs de los metales nobles. La selectividad del sensor se logra mediante la apropiada modificación química de la superficie de la NP con monocapas auto-ensambladas de una amplia variedad de elementos de reconocimiento molecular tales como enzimas, anticuerpos o ADN<sup>7</sup>. En la figura 2.2 se esquematiza el funcionamiento del biosensor desarrollado por Riboh y colaboradores<sup>8</sup>. En éste, un arreglo paralelo de nanotriángulos de plata (de aproximadamente 100 nm de ancho en el plano y 50 nm de alto) fueron soportados sobre una base de mica. La superficie de las NPs fue modificada químicamente mediante la adhesión de una monocapa de moléculas de ácido 11-mercaptopundecanoico (11-MU) y 1-octanotiol (1-OT), en relación aproximada 1:3. La biotina fue covalentemente enlazada a los grupos carboxilo hasta obtener un recubrimiento aproximado de 1 a 5 % de la superficie, lo cual representa entre 60 y 300 moléculas de biotina por partícula. La presencia del anticuerpo (anti-biotina) fue detectada mediante el corrimiento de 38 nm de su  $\lambda_{\text{max}}$  de extinción en el espectro LSPR, una vez enlazado, respecto del espectro LSPR de la superficie biotinada.

Un segundo ejemplo de detectores nanotecnológicos, en los cuales se logra una mejora significativa en la capacidad de detección respecto de sus análogos microtecnológicos lo representan los sensores nanomecánicos<sup>13,14</sup>. Los transductores sensibles a la masa son la

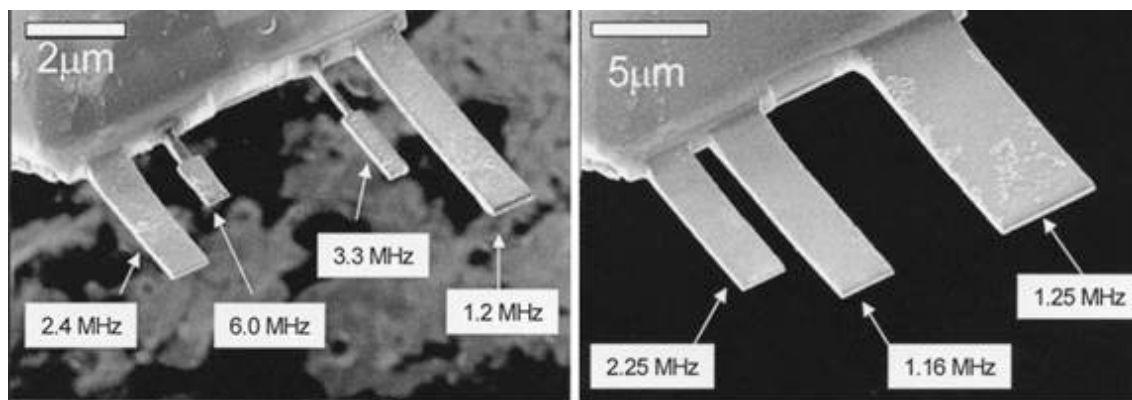


**Fig. 2.2:** Diagrama esquemático de un sensor nanotecnológico desarrollado para la realización de inmunoensayos en tiempo real: (1, azul) representa la superficie y el espectro LSPR de la NP de plata biotinada, (2, rojo) representa la superficie y el espectro LSPR de la NP de plata una vez enlazada la anti-biotina. Figura adaptada de Riboh *et al.*<sup>8</sup>.

base de los diferentes tipos de sensores mecánicos, tales como microbalanzas de cristal de cuarzo y dispositivos de ondas acústicas de superficie<sup>5</sup>. Los “*micro-cantilevers*” (micro-palanca o microvoladizos) son dispositivos que pueden transducir varios fenómenos, tales como los cambios de masa, temperatura, calor y tensión de flexión (modo estático), o un cambio en la frecuencia de resonancia (modo dinámico), los cuales pueden ser fácilmente monitoreados<sup>13</sup>. Un *micro-cantilever* consiste en una tira de carburo de silicio, con dimensiones que van desde decenas a cientos de  $\mu\text{m}$  de largo, algunas decenas de  $\mu\text{m}$  de ancho y cientos de nm de espesor. El hecho de que la frecuencia de resonancia del *nano-cantilever* varíe en proporción a la masa de los objetos que descansan sobre sí hace que éstos puedan detectar hasta *atogramos* ( $1 \text{ ag} = 1 \times 10^{-18} \text{ g}$ ), aunque el objetivo es detectar la masa de las moléculas individuales. Lavrik *et al.*<sup>14</sup> lograron construir *nano-cantilevers* de silicio recubiertos de oro de 2-6  $\mu\text{m}$  de largo y 50 a 100 nm de espesor que tenían frecuencias de resonancia en el rango de 1 a 6 MHz (figura 2.3).

Otro ejemplo de sistema nanotecnológico lo constituye el desarrollo de un nanoelectrodo modificado con nanocompuestos (NC) de polianilina/Au, para ser utilizado como nanosensor de dopamina<sup>18</sup>. La película del NC de polianilina/Au se depositó en el extremo expuesto de la punta del nanoelectrodo (figura 2.4A). Con este método modificado, los NCs permanecen firmemente adheridos sobre la superficie del electrodo, persistiendo la punta del mismo todavía afilada, hecho que fue comprobado mediante microscopía elec trónica de barrido (SEM, siglas en inglés para *Scanning Electron Microscopy*). El nanoelectrodo

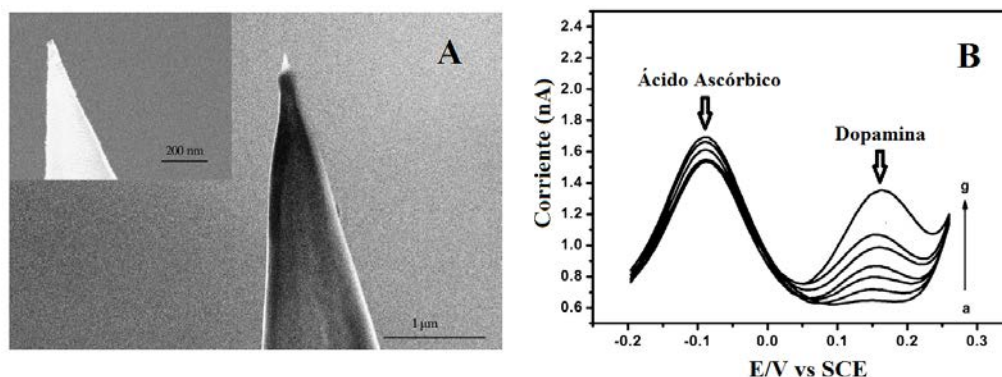




**Fig. 2.3:** Micrografía de *micro-cantilevers* de silicio donde se pueden apreciar las dimensiones aproximadas de los mismos, así como la frecuencia de vibración asociada. Figura adaptada de Lavrik y Datskos<sup>14</sup>.

modificado exhibe una excelente actividad electro-catalítica para la oxidación del ácido ascórbico y la dopamina en una solución reguladora de fosfato. La separación del potencial de pico anódico del ácido ascórbico y la dopamina llega a 250 mV (figura 2.4B). Los voltamogramas de pulso diferencial indican que la dopamina se puede determinar selectivamente en presencia de concentraciones miles de veces más altas de ácido ascórbico. Este dispositivo proporciona un excelente ejemplo de la construcción de un sistema nanotecnológico, el cual pudiera ser utilizado para la detección *in vivo* de la dopamina.

Un último ejemplo de un sistema nanotecnológico lo encontramos en el caso de los CNTs de pared múltiple (MWCNTs, del inglés *Multiwalled Carbon NanoTubes*), empleado para construir la sonda de barrido de un microscopio de fuerza atómica (MFA), la cual se utilizó para obtener mapas de altura de la superficie de micro y nanoestructuras (figura 2.5A)<sup>19</sup>. Los mapas de altura de las superficies obtenidas con la sonda de MWCNTs fueron comparadas con los obtenidos utilizando una sonda convencional de silicio sobre las cuatro superficies estudiadas (regla de silicio, microcanales de un polímero, nanomembrana de silicio y partículas de NCs metálicos). Los resultados de la regla de silicio, microcanales y muestras de membrana (figura 2.5B), revelan que los mapas de altura de las superficies obtenidos

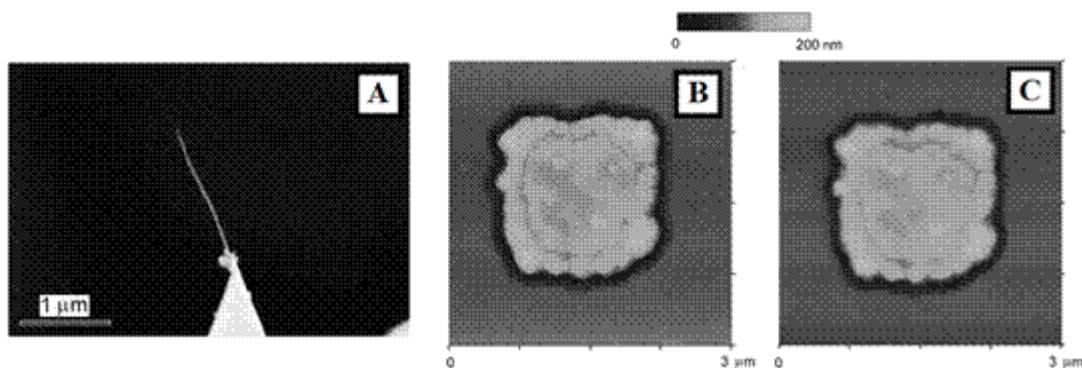


**Fig. 2.4:** (A) Micrografía SEM donde se puede apreciar la punta del nanoelectrodo modificado con un NC de polianilina/Au; (B) Voltamogramas de pulso diferencial para la oxidación conjunta de ácido ascórbico (AA) y dopamina (DA), realizados para concentraciones variables de DA (a → g: 0, 3, 10, 25, 50, 80, 100 y 200  $\mu$ M), manteniendo constante la concentración de AA en 0,7 mM. Se aprecia una diferencia de 250 mV entre los potenciales de pico de oxidación de AA-DA. Figura adaptada de Zhang *et al.*<sup>18</sup>.

con la sonda con MWCNTs tienen una mejor resolución que los obtenidos con la punta de silicio convencional (figura 2.5C). Resultados muy similares fueron obtenidos en el caso de las partículas de NCs metálicos. De lo anterior se desprende que la punta más aguda de la sonda con MWCNTs es especialmente útil para observar mapas de altura de superficies que tienen una mayor irregularidad.

### 2.3.3. Nanosistemas analíticos

Tal y como se señaló anteriormente, un nanosistema analítico propiamente dicho es una situación netamente ideal (imposible de alcanzar en la práctica); sin embargo, también dijimos que es posible construir nanosistemas que integren con éxito los dos tipos de sistemas previamente descritos, incorporando tanto NMs como explotando las extraordinarias propiedades del tamaño nanométrico. Estos dispositivos los podemos llamar apropiadamente *nanosistemas analíticos* (figura 1, cuadro de texto 1). Ejemplos de tales sistemas los encontramos en casos como los CNTs individuales utilizados como electrodos<sup>20</sup>, sistemas supramoleculares que reconocen selectivamente un analito<sup>21</sup> y los llamados “laboratorios sobre una partícula” (del inglés *lab-on-a-particle*)<sup>22</sup>.



**Fig. 2.5:** Micrografías SEM que muestran: (A) la sonda de MWCNTs bien alineada con respecto al ápice de la punta de silicio (requerimiento crítico para obtener la mejor resolución de las imágenes); (B) y (C) mapas de altura de la superficie de una membrana de silicio utilizando respectivamente, la sonda de MWCNT y la sonda de silicio convencional. Figura adaptada de Bhushan *et al.*<sup>19</sup>.

Para ejemplificar los nanosistemas analíticos comenzaremos por señalar el caso de un biosensor basado en una nanoaguja fabricada uniendo un MWCNT a una punta afilada de tungsteno<sup>20</sup>. El dispositivo utilizado como nanoelectrodo resultó ser el biosensor más pequeño de su tipo reportado hasta esa fecha (año 2006), con dimensiones de 30 nm de diámetro y 2-3 μm en longitud. El biosensor se aplicó con éxito a la determinación voltamperométrica directa de la dopamina, sugiriendo que muchas otras especies electroactivas, tales como el ácido ascórbico, la acetilcolina y el citocromo *c*, pueden ser detectadas en volúmenes menores a 1 pL, utilizando estas nanoagujas sin ninguna modificación química. Adicionalmente, la modificación química o biológica de las nanoagujas podría conducir al desarrollo de una amplia variedad de nano-biosensores para la determinación de biomateriales electroquímicamente inactivos. De hecho, en este mismo trabajo se reporta que las nanoagujas modificadas con enzimas hicieron posible la detección del glutamato, otro neurotransmisor fisiológicamente importante.

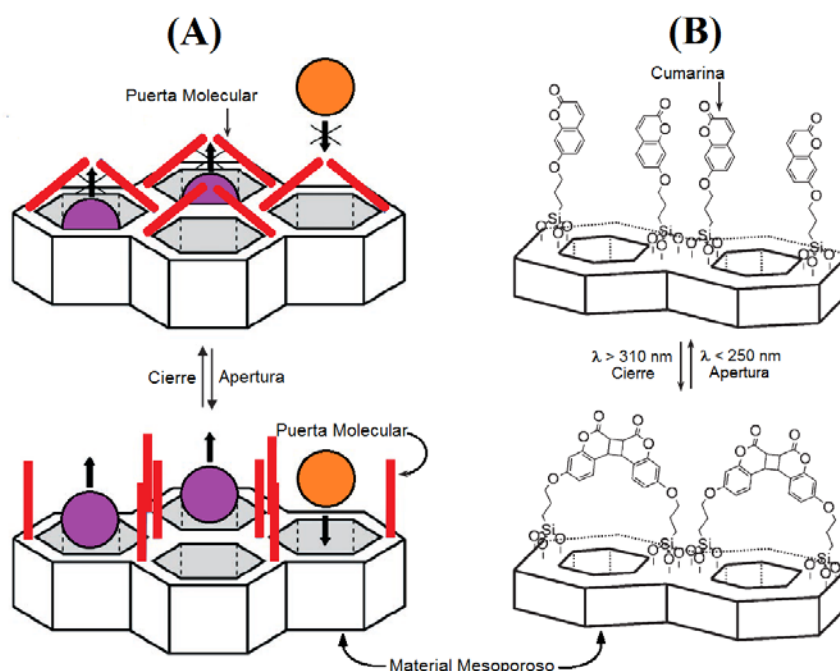
Otros ejemplos de nanosistemas analíticos los encontramos en el artículo de revisión de Burns *et al.*<sup>21</sup>, donde se presentan las virtudes funcionales y la versatilidad que ha introducido la sílice como material base para encapsular colorantes fluorescentes, que son aplicados especialmente en los campos de la nano-biotecnología y las ciencias de la vida. El poder de la sílice como material anfitrión es doble. En primer lugar, la encapsulación de los colorantes orgánicos en una matriz de sílice puede mejorar su estabilidad y el rendimiento de los mismos (por ejemplo, el brillo). En segundo lugar, la posibilidad de sintetizar partículas con arquitectura de núcleo-envoltura (del inglés *core-shell*) permite que múltiples funciones puedan ser reunidas en un solo dispositivo, mediante la incorporación y separación en diferentes capas. El primero de estos dos puntos, revela un aspecto interesante de la nanotecnología, es decir, la capacidad de mejorar una tecnología existente a través de la aplicación de estructuras y materiales de muy pequeña escala.

En otro orden de ideas, es conveniente recordar que los colorantes orgánicos han sido investigados durante décadas. Así pues, debemos señalar que se han desarrollado y optimizado colorantes orgánicos solubles en agua y ahora están disponibles comercialmente con precios por peso mucho mayores que los del oro<sup>21</sup>. Sin embargo, a través de su encapsulación en NPs núcleo-envoltura de sílice, solubles en agua, se pueden reducir significativamente los costos y al mismo tiempo catapultar las características y el rendimiento de tintes relativamente baratos a niveles competitivos.

En la segunda parte de la revisión<sup>21</sup> se ejemplifica el concepto de núcleo-envoltura mediante el diseño de NPs de sílice fluorescentes para la construcción de sensores. Como material base para la construcción de las sondas fluorescentes, la sílice proporciona un vehículo química y mecánicamente estable, que puede proteger de perturbaciones externas las moléculas del colorante encapsuladas, mientras que su superficie biocompatible puede ser fácilmente funcionalizada para interactuar con el medio ambiente externo. Igualmente, debemos recalcar que en esta revisión<sup>21</sup> se introduce un concepto verdaderamente revolucionario como es el de “laboratorio de una sola partícula” o “*laboratorio sobre una partícula*”.

También es importante presentar algunos casos de *nanosistemas analíticos* utilizando materiales híbridos (orgánicos/inorgánicos), los cuales combinan el uso de los NMs como soportes sólidos junto a estructuras supramoleculares que conducen a mejorar la funcionalidad de ambos, introduciendo el nuevo concepto “hetero-supramolecular”. Descalzo *et al.*<sup>22</sup> han realizado una excelente revisión sobre el desarrollo de este tipo de nanosistemas, los cuales representan más apropiadamente al concepto de “*laboratorio sobre una partícula*” y proporcionan un medio para salvar la brecha que existe entre la química molecular, la ciencia de los materiales y la nanotecnología. Básicamente, este tipo de nanosistemas posee una nanoarquitectura supra-molecular que incorpora entidades químicas que se pueden utilizar como una “puerta” para permitir el acceso controlado a un sitio específico en el complejo supramolecular. Los autores presentan varios ejemplos pertinentes sobre los desarrollos llevados a cabo durante los últimos años, en el marco de este novedoso concepto.

Para ejemplificar el desarrollo del concepto “hetero-supramolecular”, tomaremos puntualmente el caso de los procesos nanoquímicos cerrados en los que se utilizan NPs de sílice meso-porosas funcionalizadas con moléculas conmutables. Los poros interiores de estas



**Fig. 2.6:** (A) Representación esquemática de puertas moleculares nanoscópicas sobre las salidas y/o entradas de los poros de un material mesoporoso; (B) Apertura y cierre de los poros de un material mesoporoso mediante la funcionalización de los mismos con moléculas de cumarina. Figura adaptada de Descalzo *et al.*<sup>22</sup>.

NPs se pueden utilizar para atrapar algunas especies químicas o pueden dejarse vacíos. La puerta se abrirá tras la aplicación de un estímulo externo y luego el material libera cualquier huésped confinado o permite que ingresen las especies moleculares que se encuentran en la solución circundante<sup>22</sup>. Las estructuras híbridas cuentan con mecanismos tipo puerta de entrada/liberación, los cuales pueden ser controlados por métodos fotoquímicos, electroquímicos o iónicos. Un diagrama esquemático del funcionamiento de estos sistemas se muestra en la figura 2.6A.

Uno de los primeros reportes de procesos nanoquímicos cerrados, utilizando estructuras híbridas 3D, fue desarrollado por Fujiwara *et al.*<sup>23</sup>. Se injertan derivados fotosensibles de la cumarina en los puntos de entrada del poro de un tamiz molecular sólido mesoporoso (de tipo MCM-41<sup>24</sup>) con un diámetro de poro de aproximadamente 2,5 nm y un área superficial específica de aproximadamente 850 m<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup>. La irradiación con luz de longitud de onda mayor a 350 nm produce la foto-dimerización del núcleo de cumarina y la formación del dímero de ciclo-butano, que cierra los poros. El monómero cumarina es regenerado y los poros reabiertos por foto-escisión del dímero mediante la irradiación con luz de mayor energía ( $\lambda < 250$  nm, figura 2.6.B). Este ejemplo muestra cómo el uso de un proceso simple (foto-dimerización) en combinación con arquitecturas 3D (por ejemplo, sólidos mesoporosos) permite la regulación de una función supramolecular como la liberación o absorción de una especie química en forma controlada.

#### 2.4. Incorporación de los NMs en los procesos analíticos

Esta es el área más ampliamente estudiada de la nanotecnología analítica. El objetivo es

aprovechar las excelentes propiedades de las NPs para mejorar métodos analíticos bien establecidos o para desarrollar otros aplicables a nuevos analitos o matrices. Además de las ventajas típicas de las NPs, su uso debe conducir a la mejora de la selectividad, sensibilidad, rapidez, miniaturización o portabilidad de los sistemas de análisis. La nanotecnología avanza día tras día, por lo tanto, es posible encontrar nuevos NMs con propiedades atribuibles inequívocamente a sus dimensiones nanométricas que los convierten en potenciales herramientas para su aplicación en el proceso analítico.

Un proceso analítico puede incluir varios pasos, tal y como se representa en la figura 2.7, a saber: 1) preparación de las muestras (incluido el muestreo); 2) separación de las especies de interés mediante técnicas cromatográficas (cromatografía líquida (LC) o cromatografía de gases (GC)) y/o electroforesis capilar; 3) detección y 4) procesamiento de datos para ofrecer los resultados, según sea necesario. El papel de los NMs difiere entre las diferentes etapas del proceso analítico. En la figura 2.7 se muestra además la proporción de participación que hasta la fecha se ha determinado tienen los diferentes NMs en cada una de las etapas del proceso analítico<sup>25</sup>.

Para facilitar la discusión sobre el rol que desempeñan los diferentes NMs en cada una de las etapas del proceso analítico, resulta conveniente clasificar los mismos de acuerdo a la naturaleza o composición química que presentan. En tal sentido, los NMs pueden ser clasificados como: 1) inorgánicos (por ejemplo, las NPs de metales nobles, óxidos metálicos, puntos cuánticos, etc.); 2) orgánicos (fullerenos, CNTs, dendrímeros, PIMs, etc.) y 3) mixtos o híbridos (NPs de oro modificadas con calixarenos, CNTs funcionalizados con ferroceno, etc.). Vale la pena destacar que en la actualidad existe un interés creciente en el desarrollo de NPs híbridas, las cuales pueden ser definidas como NMs bien organizados formados por la unión de dos o más nano componentes individuales<sup>26</sup>.

En las siguientes secciones se presenta de la manera más concisa posible el rol desempeñado por los NMs más utilizados en las diferentes etapas del proceso analítico.

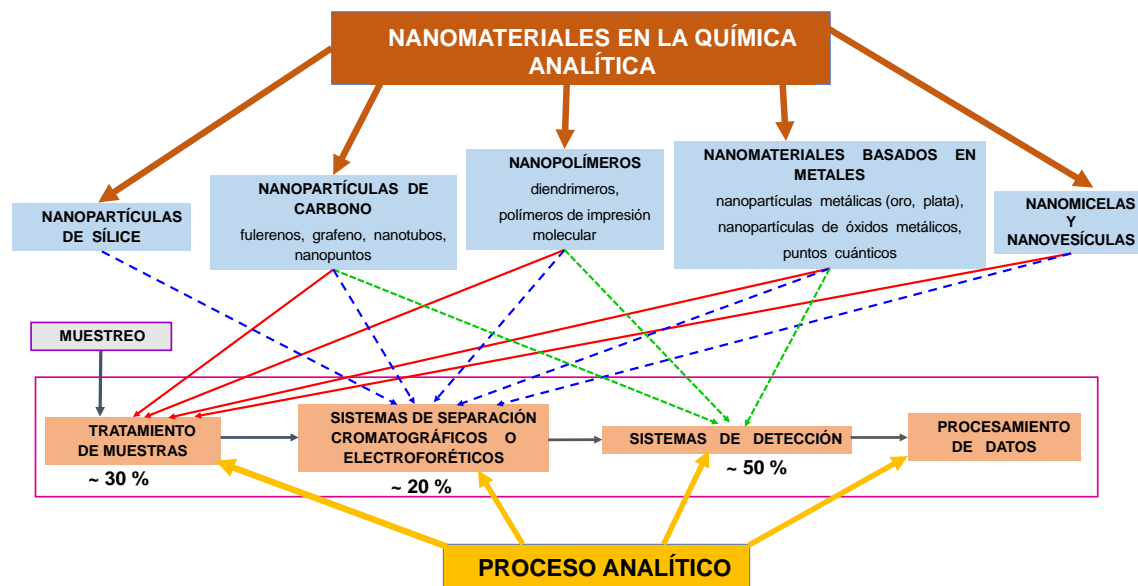
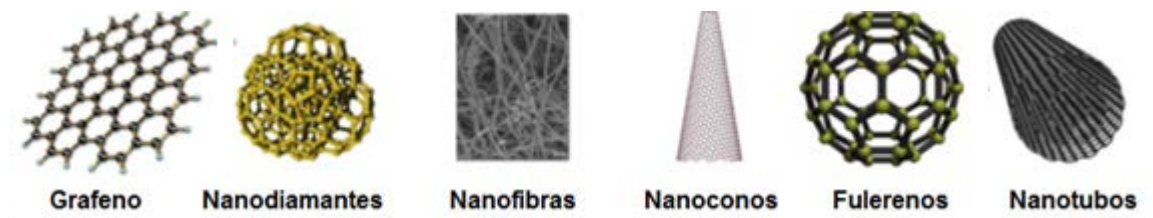


Fig. 2.7: Participación de los diferentes NMs en cada una de las etapas del proceso analítico.



#### 2.4.1. Rol de los NMs orgánicos en el proceso analítico

##### 2.4.1.1. NMs basados en carbono:

Las NPs a base de carbono se han utilizado ampliamente en aplicaciones analíticas. Aunque las razones para la selección de un alótropo particular sobre otro siguen siendo imprecisas y, en gran medida, se basan en experiencias anteriores y disponibilidad, una amplia variedad de materiales a base de carbono están disponibles y se han aplicado a los procedimientos analíticos. En la figura 2.8 se muestran algunos de los NMs basados en carbono más utilizados en los procesos nanoanalíticos<sup>27</sup>; intervienen principalmente en las etapas de tratamiento de muestras, separación y detección, destacándose entre ellos el grafeno, los fullerenos y los CNTs. Por lo tanto, tomaremos estos tres NMs para ilustrar su rol en el proceso analítico.

**CNTs:** los nanotubos fueron descubiertos en 1991 por Iijima<sup>28</sup>; se caracterizan por tener diámetros de unas pocas décimas a decenas de nanómetros y una longitud de hasta centímetros. Los CNTs pueden ser considerados como una hoja de grafeno en forma de un cilindro hueco, limitado en los extremos por estructuras tipo fullereno. Fundamentalmente se distinguen dos tipos de CNTs, los de pared simple (SWCNTs, siglas en inglés para *Single Walled Carbon NanoTubes*) y los de pared múltiple (MWCNTs, definidos previamente y que están formados por dos o más capas cilíndricas concéntricas de láminas de grafeno sin fisuras, dispuestas coaxialmente alrededor de un núcleo central). Sus áreas superficiales van desde 150 hasta 1500 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>, propiedad que les permite servir como excelentes adsorbentes. Dependiendo del diámetro y helicidad (magnitud física asociada al giro o *espín*) de la hoja de grafito, los CNTs pueden ser metálicos o semiconductores<sup>29</sup>. Debido a las propiedades mecánicas, eléctricas, térmicas y magnéticas únicas de los CNTs, los mismos han sido utilizados en varias etapas del proceso analítico<sup>30-32</sup>. Además, los CNTs pueden ser fácilmente funcionalizados, covalente o no covalentemente, con diferentes moléculas orgánicas para proporcionar una interacción más selectiva con los analitos. Hasta ahora, los CNTs han sido los NMs basados en carbono más utilizados en la preparación de muestras y cientos de artículos de investigación y decenas de artículos de revisión crítica están disponibles en este campo<sup>27,30-34</sup>.

- **Usos de los CNTs con base en sus propiedades de sorción.** El rol de los CNTs como materiales adsorbentes en el proceso analítico se inicia cuándo en el grupo de investigación de Jiang, en China, empacaron por primera vez MWCNTs en cartuchos comerciales para la extracción en fase sólida (SPE, del inglés *Solid Phase Extraction*) y los utilizaron para la extracción de contaminantes orgánicos en muestras acuosas<sup>35</sup>. Desde entonces, los

diferentes tipos de CNTs, incluyendo MWCNTs no funcionalizados o modificados y los SWCNTs, se han utilizado como materiales de empaque para la preconcentración de compuestos fenólicos, pesticidas, productos farmacéuticos, iones inorgánicos (principalmente metales) y compuestos órgano-metálicos en aguas, muestras ambientales, alimentos y muestras biológicas, investigaciones que se resumen en diversos artículos de revisión<sup>27,32-34,36-39</sup>. Hussain y Mitra<sup>40</sup> resaltan las excelentes características de los CNTs que los convierten en adsorbentes ideales para la fabricación de diferentes tipos de microconcentradores o trampas microadsorbentes.

Los CNTs no modificados pueden ser utilizados como adsorbentes en SPE, especialmente si los iones metálicos se acomplejan con un agente quelante adecuado<sup>34</sup>. Sin embargo, los CNTs originales son insolubles y difícilmente dispersables en varios tipos de solventes debido a las fuertes interacciones de van der Waals, dificultando la adsorción de los iones metálicos. El tratamiento adecuado de la superficie de los CNTs mejora la dispersabilidad y también la adsorción de los metales y la selectividad de la SPE<sup>34,36,39</sup>. Después de la oxidación en condiciones extremas, los CNTs poseen grupos hidroxilo, carboxilo y carbonilo en su superficie, los cuales les confieren una excepcional eficacia para la adsorción de metales cuando el pH de la solución es mayor que el punto isoeléctrico de los CNTs oxidados. De esta manera, los CNTs oxidados pueden ser utilizados como materiales de extracción de compuestos metálicos previo a su determinación analítica<sup>34,36</sup>. Adicionalmente, se pueden incorporar grupos funciones a los CNTs oxidados (por ejemplo, aminas, ésteres, cadenas de alquilo y polímeros) a través de la creación de enlaces amida, la técnica de plasma-N<sub>2</sub> y la adición de radicales con sales de aril-diazonio, para pre-concentrar de manera eficiente y selectiva trazas de iones metálicos, tal y como se describe en el artículo de revisión de Sitko *et al.*<sup>39</sup>. El-Sheikh comparó la capacidad de enriquecimiento de CNTs, originales y oxidados, para la adsorción de Cr(III), Mn(II), Pb(II), Cu(II), Cd(II) y Zn(II) previo a su determinación mediante Espectroscopia de Absorción Atómica Electrotérmica (ETAAS)<sup>41</sup>. Para todos los metales analizados, los CNTs oxidados presentan mejores capacidades de adsorción en comparación con los no oxidados, los cuales mostraron una notable menor sensibilidad hacia los iones metálicos.

Otra modificación interesante de los CNTs para la determinación de analitos orgánicos es la introducción de MIPs en su superficie, logrando de esta manera una de las formas más selectivas para realizar SPE, gracias a la capacidad de reconocimiento predeterminada de los MIPs. Cuando los CNTs se utilizan como materiales para soportar los MIPs, las fases estacionarias resultantes tienen buena resistencia mecánica y estabilidad química con los sitios de unión situados en la capa exterior del material compuesto. Este hecho se opone claramente a la de los MIPs tradicionales, donde las cavidades generadas no pueden estar en la superficie o en su proximidad. Por lo tanto, la accesibilidad de la molécula modelo es ampliamente mejorada, el tiempo de unión se reduce y la eficacia de la extracción se ve reforzada<sup>42</sup>.

Los CNTs también se pueden inmovilizar fácilmente dentro de la estructura de poro de una membrana polimérica, pudiendo mejorar drásticamente el rendimiento de extracción de la membrana. Aquí los CNTs sirven una vez más como adsorbentes y proporcionan

una vía adicional para el transporte de solutos. La presencia de los CNTs aumenta el área superficial efectiva y el coeficiente global de partición en la membrana y conducen a una mejora en el transporte de los analitos<sup>43</sup>. Adicionalmente, se debe señalar que similar a otros NMs basados en carbono, los CNTs pueden ser modificados con partículas magnéticas y utilizarse como material adsorbente en la extracción en fase sólida magnética (MSPE, del inglés *Magnetic Solid Phase Extraction*) para el enriquecimiento de analitos orgánicos o de metales trazas<sup>37,39</sup>. La MSPE será retomada más adelante y tratada en detalle.

Es importante indicar que las excelentes propiedades de adsorción de CNTs, junto con su estabilidad térmica y química, los hacen muy atractivos para el desarrollo de nuevas fases estacionarias para LC y GC y fases pseudo-estacionarias en electroforesis capilar (CE). Las propiedades cromatográficas de los MWCNTs fueron descritas por primera vez por Li *et al.*<sup>44</sup>. Los MWCNTs demostraron ser excelentes alternativas al carbón activado y carbón grafitado para la separación de compuestos polares (por ejemplo, alcoholes, cetonas y ésteres) por GC. El bajo número de grupos polares y la homogeneidad de la superficie de los MWCNTs llevan a una cinética de adsorción más rápida y, por lo tanto, a picos más simétricos. La estructura única de los MWCNTs proporciona a la fase estacionaria una energía de unión más fuerte, lo que resulta en tiempos de retención más altos y en una separación cromatográfica más eficiente.

Por otra parte, los CNTs presentan una marcada tendencia a la agregación, lo que afecta negativamente no solo a la adsorción mediante la reducción de su superficie activa, sino que también afecta directamente sus propiedades nanométricas<sup>45</sup>. Debido a ello, se prefieren los métodos de auto-ensamblaje, a través de los cuales es posible preparar películas delgadas de los CNTs en la superficie de la columna cromatográfica, al empacado directo del sólido en la misma. El procedimiento general utilizado para tal fin se basa en la síntesis directa de CNTs en la pared de la columna cromatográfica, utilizando el método de deposición química de vapor catalítica (CVD, siglas del inglés para *Catalytic Chemical-Vapor-Deposition*)<sup>46</sup>.

La aplicación de los CNTs como fases estacionarias en LC se ha desarrollado en menor medida. Sólo unos pocos estudios en la literatura se encuentran dedicados a esta aplicación. Li *et al.*<sup>47</sup>, han propuesto recientemente la incorporación SWCNTs en una fase estacionaria monolítica de un polímero orgánico. La presencia de los SWCNTs mejoró la separación cromatográfica de cuatro analitos modelo (uracilo, fenol, N, N-dietil-m-toluamida y tolueno), reflejado en el incremento de su factor de retención. Menna *et al.*<sup>48</sup>, evaluaron el uso de microesferas de sílice que contienen CNTs como fase estacionaria en LC, y compararon los diferentes comportamientos de los SWCNTs y los MWCNTs; el nuevo material resultó menos hidrófobo que el material con carbón convencional, permitiendo así la separación de compuestos polares.

Los CNTs son especialmente atractivos para darle mayor versatilidad a los sistemas de CE. El principal inconveniente de la utilización de fases pseudo-estacionarias a base de CNTs es su insolubilidad en agua, así como su gran tendencia a agregarse. Para ello, se han propuesto funcionalizaciones covalentes y no covalentes que permitan la dispersión eficaz de estos NMs de carbono. Los métodos no covalentes conservan las propiedades



intrínsecas de las nanoestructuras de carbono, por lo que se prefieren estos procedimientos. Los agentes tensioactivos (por ejemplo dodecil sulfato de sodio (SDS)) pueden cubrir el carbono de manera eficiente y las dispersiones resultantes pueden ser utilizadas como fases *pseudo*-estacionarias para mejorar la resolución en EC porque presentan una alta estabilidad química, incluso en los sistemas electroforéticos<sup>49</sup>.

- **Usos de los CNTs con base en sus propiedades electrónicas.** Las propiedades electrónicas de los CNTs son indicativas de su potencial capacidad como electrodos para mediar reacciones de transferencia de electrones con especies electroactivas en solución. Además, los CNTs presentan una alta capacidad para promover algunos tipos de reacciones de transferencia de electrones, minimizar el ensuciamiento de las superficies de los electrodos, aumentar la actividad electro-catalítica y facilitar la inmovilización de moléculas tales como enzimas o anticuerpos en su superficie, permitiendo el desarrollo de biosensores. Una reciente revisión sobre las aplicaciones analíticas de los CNTs realizada por Trojanowicz<sup>32</sup> pone especial énfasis en las aplicaciones electroanalíticas de estos NMs. Esto no es sorprendente ya que las propiedades electrónicas de los CNTs han sido hasta la fecha las más ampliamente explotadas con fines analíticos.

La construcción de distintos electrodos con presencia de CNTs puede ser llevada a cabo de diferentes maneras: (a) mezclando los CNTs con un aglutinante para formar una pasta que luego es empacada en un electrodo, (b) evaporando una solución de CNTs sobre un electrodo de carbón vítreo, (c) uniendo los CNTs individuales al extremo de un alambre, (d) mediante la incorporación de los CNTs en una plataforma de biodetección o (e) microfabricación de un ensamblaje o arreglo de nanoelectrodos. Adicionalmente, los CNTs se han utilizado para modificar las superficies de electrodos en configuraciones tanto orientadas como no orientadas<sup>32,50</sup>. Los MWCNTs en configuraciones orientadas exhiben altas tasas de transferencia de electrones. Por otro lado, los SWCNTs exhiben una transferencia lenta de electrones y una capacitancia específica baja. Las superficies de los electrodos pueden ser fácilmente modificadas con CNTs mediante la evaporación de una suspensión de nanotubos en un disolvente apropiado tal como bromoformo o N, N-dimetilformamida<sup>51</sup>. También se ha reportado una variedad de electrodos modificados con CNTs, en forma de pasta<sup>52</sup> o compuestos con partículas metálicas<sup>53</sup>. Asimismo, se han construido una serie de biosensores donde los CNTs actúan como cables moleculares unidos a biomoléculas tales como proteínas, ADN, o anticuerpos<sup>50,54</sup>.

Una vez más la funcionalización covalente o no covalente de los CNTs con diferentes grupos químicos hace a los CNTs biocompatibles para la conjugación con biomoléculas, convirtiéndolos en candidatos potenciales para el desarrollo de biosensores. Grupos funcionales tales como el amino y el carboxilo, aumentan el nivel de transferencia de electrones. En la práctica, la funcionalización de los CNTs con polímeros solubles en agua o con grupos iónicos o hidrófilos ayuda a lograr la solubilización de los CNTs en medios acuosos y es un parámetro significativo para que los CNTs puedan actuar como una matriz de soporte o anclaje para el atrapamiento de proteínas/ADN/anticuerpo/enzimas. La funcionalización de CNTs también mejora la transferencia directa de electrones entre los sitios activos del elemento biológico y el electrodo. Debido a la razón anterior, la conductividad de CNTs (principalmente MWCNTs) es comúnmente

mejorada mediante la funcionalización con polímeros redox, moléculas de hapteno, derivados de tiol y N-etil-N-(3-dimetilaminopropil carbodiimida succinimida-N-hidroxi (EDS-NHS)<sup>55</sup>.

El pequeño tamaño y las excelentes propiedades electrónicas de los CNTs los hacen especialmente atractivos para el desarrollo de microelectrodos. De hecho, ya se han reportado varios de éstos para microchips de electroforesis<sup>56</sup>. Las dimensiones de los electrodos se han reducido no sólo al tamaño micro sino también al tamaño nano<sup>20,57</sup>. El primer intento de usar un CNT individual como una sonda electroquímica se reportó en 1999<sup>58</sup>; la sonda consistía en un MWCNT montado en una punta de tungsteno. Cuatro años más tarde se desarrolló un nanoelectrodo de SWCNT para la determinación de neurotransmisores en células biológicas individuales<sup>57</sup>. Por último, el primer nanobiosensor, que consistía en glutamato oxidasa inmovilizada sobre nanoagujas electroquímicas, se reportó en 2006 y el mismo fue descrito en detalle en la sección 2.3.3<sup>20</sup>.

Los CNTs también se han utilizado para desarrollar sensores químicos. Las mediciones directas de algunas propiedades electrónicas tales como su resistencia, se pueden utilizar para cuantificar la adsorción molecular de algunos compuestos de interés sobre los nanotubos<sup>59</sup>. Este principio ha sido utilizado para desarrollar sensores químicos en miniatura para detectar bajas concentraciones de moléculas gaseosas tales como N<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, CO y NH<sub>3</sub> a temperatura ambiente con una alta sensibilidad<sup>42,59,60</sup>. Los CNTs modificados química o físicamente pueden facilitar la construcción de sensores químicos no solo altamente sensibles sino también selectivos. Por ejemplo, los SWCNTs semiconductores recubiertos con una fina capa no continua de paladio metálico son extremadamente sensibles para la detección de hidrógeno molecular<sup>60</sup>.

**- Usos de los CNTs con base en sus propiedades térmicas, mecánicas y como emisores de electrones.** Los CNTs poseen una alta capacidad de conducción térmica. Su gran área superficial permite disipar el calor que se obtiene cuando se les prepara y utiliza como torres moleculares. Esta propiedad ha sido utilizada para disipar el calor de los chips y también en pequeños intercambiadores de calor para reactores nucleares<sup>31</sup>.

Las propiedades de adsorción o las interacciones moleculares de los CNTs se encuentran relacionadas de alguna manera con su uso como puntas o sondas, con el fin de mejorar la resolución espacial en la microscopía de fuerza atómica (AFM)<sup>19,61</sup>. Además, estos CNTs pueden derivarse y funcionalizarse en sus extremos. Las puntas de CNTs se prepararon primero uniendo mecánicamente nanotubos a la punta de *nano-cantilevers* comerciales usando adhesivo acrílico. En la actualidad, las puntas se construyen preferiblemente mediante la unión *in situ* de los CNTs sobre las puntas de AFM durante la observación o por deposición química de los CNTs<sup>61</sup>.

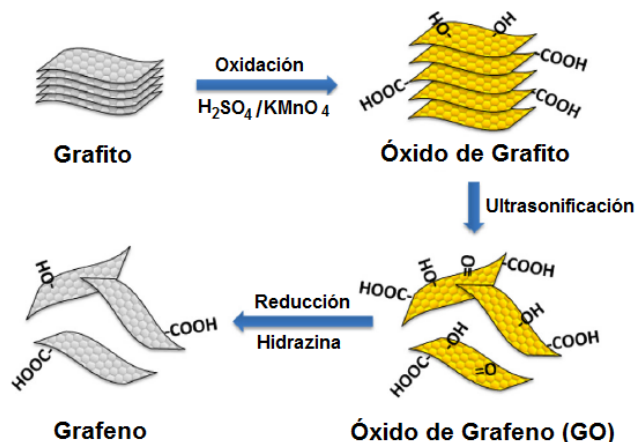
Una de las propiedades más interesantes de la CNTs es su condición de emisores de campos (electrones). Los emisores de electrones construidos con CNTs individuales se han fabricado en un proceso de dos etapas que implican (a) producir microfibras de carbono que contienen CNTs individuales en sus núcleos por un método de deposición química en fase de vapor y (b) exponer los nanotubos por fractura mecánica de las fibras, seguido del montaje de la fibra a un alambre de cobre<sup>62</sup>. Estos emisores de electrones con

fibras de nanotubos muestran bajos voltajes de operación, generan un campo alto mejorado y producen haces de electrones finos. Las características de emisión de campo y durabilidad de estas estructuras ofrecen aplicaciones prometedoras para los instrumentos de análisis donde se requieren fuentes de electrones de alto rendimiento como en el caso del desarrollo de fuentes de rayos X microfocalizadas o incluso para obtener microplasma.

**Grafeno:** aunque no son tan populares sus aplicaciones analíticas como las de los CNTs, el grafeno es otro nanomaterial que muestra un futuro prometedor en el área de la química analítica, desde su descubrimiento por Novoselov *et al.* 2004<sup>63</sup>. Similarmente a los CNTs, el grafeno consiste en una lámina de un átomo de carbono de espesor (hibridizado  $sp^2$ ), compuesta por anillos de seis miembros mostrando un área de superficie expuesta que es casi dos veces superior a la de los SWCNTs<sup>64,65</sup>. Otras ventajas de este material, que lo hacen atractivo para aplicaciones analíticas, incluyen su alta resistencia mecánica, alta elasticidad, alta conductividad térmica y eléctrica, bajo costo, seguridad y facilidad de producción en comparación con otros NMs basados en carbono, biocompatibilidad aceptable, y la ausencia de impurezas metálicas que pueden afectar la precisión de un sensor<sup>27,33,55,64,65</sup>.

Aunque la disponibilidad comercial de grafeno de alta calidad es bastante limitada, el mismo puede ser fabricado usando una variedad de métodos. Novoselov *et al.*<sup>63</sup> fueron capaces de obtener películas de alta calidad (de hasta 10  $\mu\text{m}$  de longitud y que se mantuvieron estables en condiciones ambientales) mediante la exfoliación mecánica (raspado repetido) de pequeños pedazos de grafito pirolítico altamente ordenados. Desde entonces, muchos otros métodos de fabricación se han desarrollado, incluyendo descomprimir MWCNTs para formar cintas de grafeno<sup>66</sup>, por deposición química de vapor (CVD) en láminas y películas de cobre<sup>67</sup>, logrando la producción de metros cuadrados de grafeno<sup>68</sup>. Mientras que los métodos de fabricación ciertamente se han vuelto más ampliamente disponibles, es importante tener en cuenta que aunque es posible fabricar láminas de grafeno individuales, estas hojas tienen una tendencia a permanecer juntas formando nanoestructuras de múltiples capas<sup>69</sup>, por lo que antes de trabajar con estos materiales debe realizarse una caracterización cuidadosa y completa de los mismos.

- **Usos del grafeno con base en sus propiedades de sorción.** El grafeno se utilizó como adsorbente para SPE mediante el empacado del mismo en un cartucho comercial para extraer clorofenoles<sup>70</sup> y metales pesados (Pb o Cr con diferentes reactivos quelantes)<sup>71,72</sup> en muestras de agua, glutatión en plasma humano<sup>73</sup> y neurotransmisores de cerebro de ratas<sup>74</sup>. Su rendimiento se evaluó mediante la comparación con varios materiales adsorbentes usados normalmente, incluyendo sílice  $C_{18}$ , carbono grafito y CNTs, en óptimas o iguales condiciones. Sin embargo, el grafeno más pequeño podría escapar del cartucho y la agregación del grafeno podría ocurrir cuando el grafeno o su óxido se utilizan directamente como adsorbentes en SPE<sup>75</sup>. Para evitar estos problemas, el óxido de grafeno (GO) fue enlazado a los grupos amino de un adsorbente de sílice amino-terminado en fase orgánica. El grafeno polar GO@sílice puede ser utilizado como SPE en fase normal para éteres polibromados hidroxilados de difenilo y el grafeno@sílice, obtenido por reducción del óxido con hidrazina (ver figura 2.9), podría ser utilizado como fase inversa para clorofenoles o péptidos<sup>76</sup>.



**Fig. 2.9:** Representación esquemática de la preparación de grafeno mediante la reducción química con hidracina. Por lo general, implica la oxidación del grafito natural, después de exfoliación en láminas de GO individuales mediante ultrasonificación y reducción final para formar el grafeno<sup>75</sup>.

El grafeno puede ser modificado con partículas magnéticas para su uso en MSPE. En un proceso de MSPE se produce una transferencia rápida de masa (tiempos de equilibrio cortos) y el analito cargado en el adsorbente puede ser separado fácilmente a través de un campo magnético externo<sup>77</sup>. El grupo de Wang en la Universidad de Hebei, China, sintetizó NPs de grafeno magnético mediante co-precipitación química *in situ* de Fe(II) y Fe(III) en una solución alcalina en presencia de grafeno y lo aplicaron en la extracción de una serie de contaminantes, tales como ésteres de ftalato<sup>78</sup>, herbicidas de triazina<sup>79</sup>, pesticidas carbamata-dos<sup>80</sup>, y fungicidas de triazoles<sup>81</sup> en muestras líquidas, logrando factores de enriquecimiento de 247 a 5824.

La técnica de microextracción en fase sólida (SPME, por las siglas del inglés para *Solid-Phase Micro-Extraction*) es una técnica miniaturizada libre de solventes, que integra las etapas de muestreo, extracción, preconcentración y de introducción la muestra en un solo paso<sup>82</sup>. Se basa en el equilibrio de distribución de analitos entre la matriz y una fibra revestida con una fase estacionaria por lo que el material de recubrimiento de la fibra es crítico en la mejora del rendimiento de la SPME. El grafeno ha sido inmovilizado por diferentes métodos covalentes o no covalentes sobre las fibras de SPME, la mayoría de las cuales exhibe una mejor eficiencia de extracción, una mayor estabilidad mecánica y térmica, y una vida más larga que los materiales comerciales para SPME. La primera fibra de SPME recubierta con grafeno se preparó sumergiendo repetidamente un alambre de acero inoxidable limpio en una suspensión de grafeno y secándolo al aire para obtener un recubrimiento de tan solo 6-8  $\mu m$  de espesor<sup>83</sup>.

- **Usos del grafeno con base en sus propiedades electrónicas.** La química nano-electroanalítica es un campo interdisciplinario en crecimiento, que combina características de la electroquímica (por ejemplo, la simplicidad, velocidad, alta selectividad y alta sensibilidad) con propiedades únicas de los NMs (por ejemplo, electrónicas, ópticas, magnéticas y catalíticas) para convertirse en uno de los tópicos de mayor interés en el área de la química analítica<sup>84</sup>. En este sentido, el grafeno no sólo actúa como un excelente y avanzado soporte para inmovilizar diferentes analitos debido a su gran

superficie sino que, además, puede promover la transferencia efectiva de electrones entre el electrodo y dichos analitos<sup>84</sup>. Por esta razón, el grafeno ha tomado un rol estelar en el desarrollo de sensores y biosensores con fines analíticos<sup>65</sup>. Dado lo vasto y sofisticado que resulta el campo de acción del grafeno como fruto de sus propiedades electrónicas, a los fines de ejemplificar sus aplicaciones en el área de la química analítica, centraremos nuestra atención en el desarrollo de sensores y biosensores nano-electroanalíticos.

*Sensores nano-electroanalíticos.* Papakonstantinou *et al.*<sup>85</sup> fueron los primeros investigadores en usar grafeno para la detección electroquímica. Para ello, crecieron películas de grafeno en sustratos de sílice utilizando un método no catalítico. Las películas de grafeno tenían un espesor de varias decenas de nanómetros y, por lo tanto, contenían varios cientos de hojas de grafeno apiladas. El grafeno mostró una cinética de transferencia de electrones rápida para la cupla ferro/ferricianuro ( $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ ) y un desempeño muy bueno para la determinación simultánea de ácido ascórbico, ácido úrico y del neurotransmisor (dopamina). El rendimiento electroquímico del grafeno fue superior al de un electrodo de carbón vítreo, pero comparable a un electrodo de grafito pirolítico de borde plano.

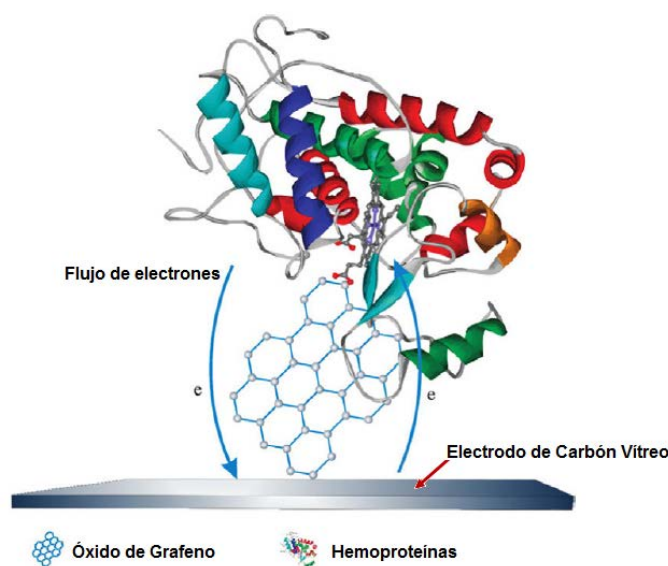
Del mismo modo, Zhou *et al.*<sup>86</sup> estudiaron con gran detalle las propiedades electroquímicas del GO reducido. Las placas de GO tenían alrededor de 1 nm de espesor, tal y como lo arrojó su caracterización mediante AFM, indicando que las mismas contenían de 2 a 3 capas de grafeno. Diferentes tipos de importantes compuestos electroactivos, orgánicos e inorgánicos, incluyendo ferricianuro de potasio, bases libres de ADN, dopamina, ácido ascórbico, ácido úrico y acetaminofén, fueron empleados para estudiar sus reacciones electro-químicas en el electrodo. El electrodo a base de grafeno mostró una cinética de transferencia de electrones más favorables que los electrodos de grafito modificado y carbón vítreo. Sin embargo, se obtuvieron diferentes características analíticas para la detección de la dopamina en comparación con el primer trabajo<sup>85</sup>, debido fundamentalmente a la diferencia en el número de capas contenidas por el grafeno.

Wang *et al.*<sup>87</sup> construyeron electrodos con grafeno y los utilizaron para la determinación electroquímica de dopamina en presencia de ácido ascórbico. Con este electrodo se consiguieron picos bien resueltos para ambos compuestos, mientras que para un electrodo de carbón vítreo los picos se superponen. Imágenes de Microscopía Electrónica de Transmisión de alta resolución (TEM, del inglés *Transmission Electron Microscopy*), revelaron una estructura de múltiples capas para el grafeno. Por lo tanto, el grafeno utilizado, y la respuesta electroquímica obtenida, fueron de nuevo diferentes a la de los dos artículos anteriormente señalados<sup>85,86</sup>.

Mencionaremos como últimos ejemplos de nanosensores electroquímicos los trabajos publicados por Li *et al.*, quienes utilizaron un electrodo modificado con una película nanocompuesta de Nafion-grafeno, para la determinación electroquímica de cadmio ( $\text{Cd}^{2+}$ )<sup>88</sup> y  $\text{Cd}^{2+}$  y plomo ( $\text{Pb}^{2+}$ )<sup>89</sup> mediante análisis con voltametría de redisolución anódica de pulso diferencial. Los autores reportaron un mayor nivel de sensibilidad para la detección de los metales pesados en comparación con un electrodo de carbón vítreo.

**Biosensores nano-electroanalíticos:** El grafeno se ha aplicado ampliamente para el desarrollo de biosensores nano-electroquímicos propiamente dichos<sup>90-91</sup>. En este sentido, una de las primeras aplicaciones reportadas fue la de Fu *et al.*<sup>90</sup>, quienes trabajaron por primera vez en la electroquímica directa de la glucosa oxidasa (GOD) inmovilizada en un electrodo modificado basado en una película compuesta de nanoláminas de grafito exfoliado (grafeno de menos de 100 nm de espesor) y Nafion. La transferencia directa de electrones entre la GOD y el electrodo se logró con una velocidad de transferencia rápida ( $12,6 \text{ s}^{-1}$ ). Además, la bioactividad de la GOD se mantuvo después de la inmovilización en la película compuesta y la glucosa se pudo determinar con base en la disminución de la respuesta electrocatalítica de la forma reducida de la GOD al oxígeno disuelto.

El GO también se ha empleado con éxito en bioelectroquímica<sup>91</sup>. El GO soporta eficazmente y mantiene un flujo eléctrico eficiente con los centros redox de varias metaloproteínas (hemoproteínas tales como citocromo C, mioglobina y peroxidasa de rábano picante) y el electrodo (ver figura 2.10). Se debe destacar que las proteínas mantienen su integridad estructural y su actividad biológica cuando se mezclan con el GO<sup>91</sup>. Estas características predicen aplicaciones prometedoras para los complejos GO/proteínas en el desarrollo de otros biosensores y celdas de biocombustibles.

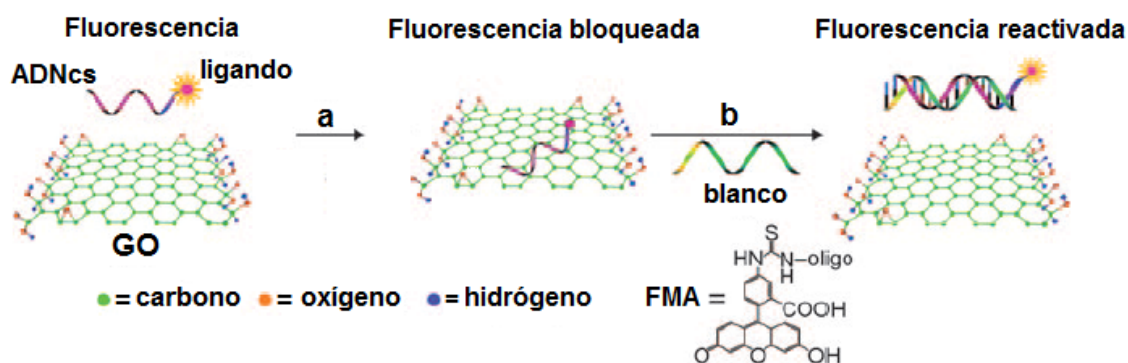


**Fig. 2.10:** Diagrama que muestra el cableado de proteínas y grafeno para la construcción de sensores nano-electroanalíticos. El complejo GO/hemoproteínas es soportado sobre la superficie de un electrodo de trabajo de carbono vítreo modificado (disco de 2 mm de diámetro). Por conveniencia, no se muestran los grupos funcionales oxigenados en la superficie del GO. Figura adaptada de Zuo *et al.*<sup>91</sup>.

- **Usos del grafeno con base en sus propiedades energéticas.** El grafeno es un NMs que dependiendo del tamaño (diámetro) de las láminas puede ser un excelente emisor de fluorescencia o actuar como inhibidor de la misma<sup>84,92</sup>. En este sentido, el grafeno y sus derivados pueden servir ya sea como donadores o aceptores de energía en un sensor de Transferencia Resonante de Energía en Fluorescencia (FRET, del inglés *Fluorescence Resonance Energy Transfer*)<sup>84,93-95</sup>.

El grafeno es un buen aceptor en los procesos de transferencia de energía debido a sus peculiares propiedades electrónicas. Cálculos fotofísicos confirman la transferencia de energía desde los ligandos fluorescentes al grafeno, convirtiéndolo en un excelente inhibidor de la fluorescencia de los estados electrónicos excitados de los ligandos<sup>92</sup>. Por lo tanto, es posible realizar detecciones fluorescentes muy sensibles usando grafeno como inhibidor de la fluorescencia<sup>84,93</sup>. Por otro lado, aunque el grafeno es un NMs que tiene una brecha de energía igual a cero, o lo que es lo mismo, los excitones en el grafeno tienen un radio de Bohr infinito, convirtiéndolo en un material no luminiscente<sup>94,95</sup>, esta situación puede cambiar drásticamente cuando el tamaño de las láminas de grafeno se reduce, ya que la brecha de energía se hace mayor a cero y los fragmentos de grafeno de menor tamaño mostrarán efectos de confinamiento cuántico<sup>96</sup> y luminiscencia luego de su excitación, con energía e intensidad inversamente proporcionales a su diámetro. Los fragmentos de grafeno son conocidos como puntos cuánticos de grafeno (GQDs, del inglés *Graphene Quantum Dots*). Un punto cuántico es un objeto de tamaño nanométrico (por lo general un semiconductor) cuyos excitones se encuentran confinados en las tres dimensiones espaciales. Los GQDs son lo suficientemente pequeños como para causar confinamiento de los excitones y un efecto cuántico de tamaño<sup>96</sup>. Típicamente, los GQDs tienen diámetros inferiores a 20 nm.

Una de las primeras aplicaciones analíticas del grafeno actuando como fuerte inhibidor FRET fue reportada por Lu *et al.*<sup>97</sup>. Estos autores utilizaron por primera vez GO soluble en agua como una plataforma para la detección sensible y selectiva de ADN y proteínas sobre la base de mediciones fluorescentes. En la figura 2.11, se muestra una representación esquemática de esta nueva plataforma de detección. En el primer paso, (a), el FMA (un ligando fluorescente a base de fluoresceína) marcado con ADNcs (ADN de cadena sencilla) es soportado sobre el GO mediante la interacción no covalente entre GO y las nucleobases del ADN; bajo tales circunstancias el GO suprime completamente la fluorescencia del FMA. En el segundo paso, (b), en presencia de una molécula diana complementaria, la interacción entre el ADN marcado con FMA y ésta es lo suficientemente grande para liberar el ADN marcado con FMA del GO, lo que resulta en la restauración de la fluorescencia del FMA. Esta detección fluorescente mejorada es única en términos de sensibilidad y selectividad para la molécula diana.

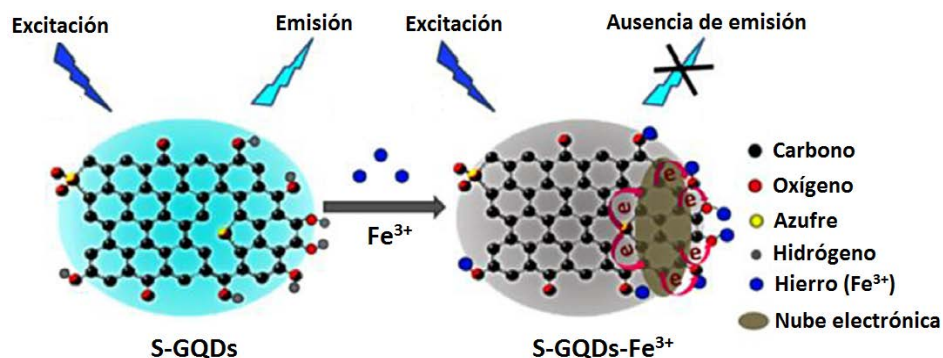


**Fig. 2.11:** Representación esquemática de un proceso analítico utilizando las propiedades inhibitoras de la fluorescencia del grafeno (FRET). Para mayor detalle ver texto. Figura adaptada de Lu *et al.*<sup>97</sup>.

Otros investigadores han desarrollado aún más esta técnica para detectar otras especies a través de diferentes diseños de ADN. Entre las nuevas especies analizadas tenemos ADN,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$ , adenosin trifosfato, entre otras; dichas determinaciones han sido recientemente reseñadas en sendos artículos de revisión<sup>84,93</sup>.

La fluorescencia de los GQDs puede ser extinguida con eficacia mediante la interacción selectiva de los mismos con cationes, aniones u otras especies químicas<sup>93,94</sup>. La estructura química de los GQDs es similar a la del GO que tiene grupos que contienen oxígeno (hidroxilo, carboxilo, epoxi y carbonilo) en sus bordes<sup>94</sup>. Aunque los GQDs pueden exhibir fuerte fotoluminiscencia, a menudo ésta es limitada por un bajo rendimiento cuántico y poca sintonizabilidad<sup>94</sup>. Sin embargo, la inserción de heteroátomos, tales como nitrógeno<sup>98</sup> o azufre<sup>99</sup> en sus cadenas de carbono, facilita la sintonización de sus propiedades físicas y químicas. El nitrógeno ha sido ampliamente utilizado para el dopaje de nanoestructuras de carbono en virtud de que tiene un tamaño atómico comparable para su unión a los átomos de carbono. El azufre, oxígeno, boro y el flúor se han utilizado con menos frecuencia para obtener GQDs dopados<sup>94</sup>.

Li *et al.*<sup>98</sup> sintetizaron y aplicaron GQDs dopados con nitrógeno y funcionalizados con glicina para determinar  $\text{Fe}^{3+}$  en agua de grifo, mediante la atenuación de la emisión fluorescente. Los átomos de nitrógeno actuaron principalmente como sitios quelantes para los iones  $\text{Fe}^{3+}$ , quienes bloquean eficientemente la fluorescencia de GQDs. En otro trabajo, Li *et al.*<sup>99</sup> desarrollaron una sonda fluorescente eficiente para la detección selectiva de  $\text{Fe}^{3+}$  en muestras de suero utilizando GQDs dopados con azufre (S-GQDs). La incorporación de átomos de S en el esqueleto carbonado sintoniza la densidad electrónica local de los S-GQDs y promueve la coordinación de los grupos hidroxilo fenólicos en los bordes de los S-GQDs al  $\text{Fe}^{3+}$ . En este caso, la interacción altamente específica es responsable de la rápida extinción de la fluorescencia de los puntos. En la figura 2.12 se ilustra el funcionamiento del sensor de  $\text{Fe}^{3+}$  y el mecanismo de extinción de la fluorescencia de los S-GQDs. Aunque hasta la fecha la determinación de  $\text{Fe}^{3+}$  ha sido la aplicación que ha despertado el mayor interés, es importante señalar que también se han desarrollado sensores fluorescentes basados en principios de funcionamiento muy similares a los mencionados arriba para  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{6+}$  y  $\text{Ni}^{2+}$ ; la descripción de los mismos se presenta de manera resumida en una excelente revisión crítica realizada recientemente por Benitez-Martínez y Valcárcel<sup>94</sup>.



**Fig. 2.12:** Representación esquemática del mecanismo de desactivación de la emisión fluorescente de los S-GQDs en presencia de  $\text{Fe}^{3+}$ . Figura adaptada de Li *et al.*<sup>99</sup>.



**Fullerenos:** los fullerenos (FLs) fueron descubiertos en 1985 a través de mediciones espectrométricas de polvo interestelar y su estructura confirmada más tarde en el laboratorio<sup>100</sup>. Los FLs son una jaula cerrada de moléculas de carbono que contienen anillos pentagonales y hexagonales. Tienen la fórmula general  $C_{20+m}$ , siendo  $m$  un número entero, y comprenden una amplia gama de isómeros y series homólogas, desde los más estudiados  $C_{60}$  y  $C_{70}$  hasta los llamados fullerenos superiores como  $C_{240}$ ,  $C_{540}$  y  $C_{720}$ . Los FLs son la tercera forma alotrópica conocida del carbono (las otras son el grafito y el diamante). Su alta afinidad por los electrones, su superficie hidrófoba y una alta relación superficie/volumen les otorga una gran capacidad de adsorción hacia moléculas orgánicas, que los hace ideales para los procedimientos de extracción<sup>27</sup>. Adicionalmente, la modificación química con grupos funcionales aumenta la selectividad de los FLs. Kroto, Curl y Smalley recibieron el Premio Nobel en 1996 por su trabajo sobre los FLs.

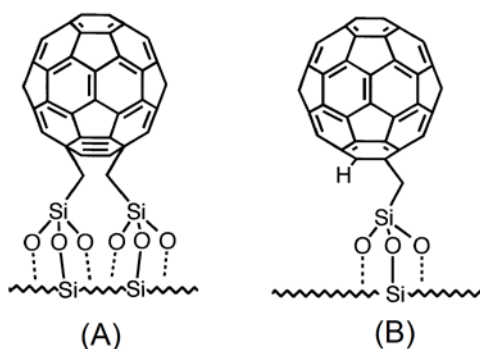
En química analítica, los FLs se pueden abordar desde dos puntos de vista diferentes. El primero ve los FLs como analitos, lo cual implica su determinación en diversas muestras, tales como tejidos biológicos o materiales geológicos. El segundo ve a los FLs como herramientas analíticas, incluyendo su uso como fases estacionarias cromatográficas, como diferentes sensores ópticos y electroquímicos (estos últimos, basados en su actividad como mediadores de electrones), y en la explotación de sus características superficiales únicas como materiales adsorbentes en los sistemas de flujo continuo para limpiar y pre-concentrar en línea diferentes analitos<sup>101,102</sup>. Como se apreciará, son muy amplias las potenciales aplicaciones de los FLs dentro del proceso analítico; sin embargo, sus propiedades adsorbentes los hacen peculiarmente atractivos en las etapas de tratamiento de muestras y separación. Hasta la fecha, esta propiedad ha sido la más utilizada en el área de la química analítica y por lo tanto centraremos nuestra atención fundamentalmente en discutir, de manera breve, las aplicaciones de los FLs relacionadas con sus propiedades de sorción.

**- Usos de los Fls con base en sus propiedades de sorción.** El grupo de investigación de Miguel Valcárcel en la Universidad de Córdoba, España, fue pionero en la utilización de FLs,  $C_{60}$  o  $C_{70}$ , como material adsorbente en sistemas de extracción SPE en línea para la pre-concentración de metales traza, tales como Pb<sup>103,104</sup>, Cu<sup>105</sup>, Cd<sup>106</sup> y Hg<sup>107</sup>. En primer lugar, las especies metálicas se convirtieron a quelatos neutros mediante quelación con diferentes ligandos (pirrolidin-ditiocarbamato de amonio (APDC) o dietil-ditiocarbamato de sodio (DDC)) para la retención cuantitativa en una mini-columna de fullereno. Después de retenidas, las especies finales se eluyeron con un disolvente apropiado (metil isobutil cetona (MIBK) o n-hexano) y se analizaron por espectrometría de absorción atómica en llama (FAAS) o ETAAS. Los FLs resultaron ser adsorbentes más eficaces para la preconcentración de los metales traza que la sílice  $C_{18}$ , el carbón activado o las resinas de intercambio iónico.

Los sistemas de extracción de flujo continuo fueron modificados por este mismo grupo de investigación para aplicar los mismos en la especiación de diferentes compuestos órgano-metálicos como metalocenos<sup>108</sup>, metalotioneínas<sup>109</sup> y alquilos metálicos<sup>107</sup>. También se utilizaron en la pre-concentración de especies orgánicas tales como benceno, tolueno, etilbenceno e isómeros de xileno<sup>110</sup>. En el grupo de Valcárcel también prepararon dos derivados de fullereno,  $C_{60}$ -DDC y  $C_{60}$ -ácido rubeánico, para la especiación de

plomo y cobre. Los derivados fueron sintetizados por reacción fotoquímica de  $C_{60}$  y DDC o ácido rubeánico en un medio de tolueno-etanol. El  $C_{60}$  se une covalentemente a los reactivos quelantes clásicos; estos derivados exhibieron una alta estabilidad entre pH 1 y 11 y pueden ser reutilizados durante al menos 6 meses<sup>104</sup>.

Las aplicaciones cromatográficas de los FLs parten de un estudio centrado en la separación y el aislamiento de los FLs por LC, el cual mostró que las fases estacionarias que contenían ligandos fenilo en su estructura podían interactuar con los FLs a través de interacciones  $\pi$ - $\pi$ <sup>111</sup>. Esta observación condujo a la investigación de los FLs como fases estacionarias, primero para LC y más tarde para GC. La retención de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) en varias fases estacionarias basadas en fullereno para LC fue estudiada por primera vez por Jinno *et al.*, quienes utilizaron fases de sílice unida a  $C_{60}$ , así como los propios  $C_{60}$ , para la separación de los HAPs<sup>112</sup> y alquilbencenos<sup>113</sup>. En la figura 2.13, se muestra una representación de dos formas posibles de unión covalente de los FLs a la matriz de sílice para ser utilizados como fases estacionarias. Adicionalmente, otras fases estacionarias basadas en FLs han sido fabricadas para LC, para lo cual los fullerenos ( $C_{60}$ - $C_{70}$ ) fueron enlazados químicamente en sílice funcionalizada o ligados directamente a perlas de polímeros<sup>114</sup>. El primer tipo de adsorbente se sintetizó por reacción entre la sílice amino terminada y el  $C_{60}$  funcionalizado, mientras que el segundo por reacción directa entre los FLs y perlas de poliestireno-divinilbenceno (PS-DVB). Al utilizar estas fases para la separación de HAPs se encontró que la fase polimérica con FLs incorporados poseía mayor capacidad que la de sílice derivatizada.



**Fig. 2.13:** Representación esquemática de dos formas posibles de unión covalente de los FLs a la sílice. (A) Utilizando dos anclajes y (B) utilizando un solo anclaje.

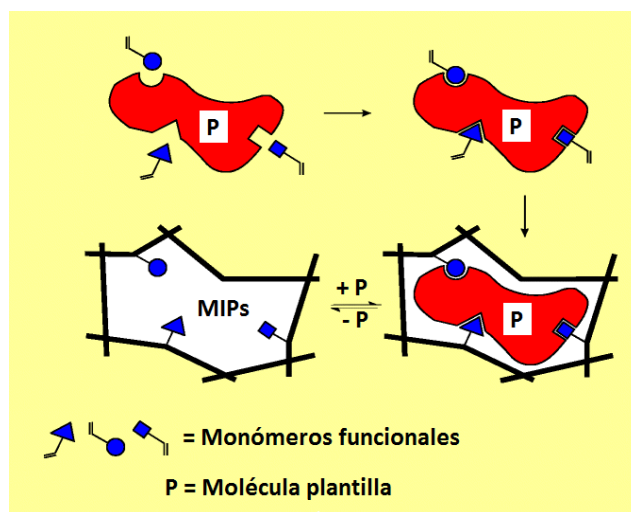
También se han hecho esfuerzos para desarrollar fases estacionarias basadas en FLs para GC. La primera aplicación en este campo consistió en el revestimiento de una columna de vidrio con  $C_{60}$ , en un estudio sobre la retención de compuestos orgánicos de alto punto de ebullición, tales como hidrocarburos aromáticos y alifáticos, aminas, alcoholes y ésteres<sup>115</sup>. Más adelante, se sintetizaron polisiloxanos conteniendo FLs con el fin de estudiar su comportamiento como fases estacionarias para GC<sup>116,117</sup>. Los mismos mostraron una excelente estabilidad térmica, operación dentro de un amplio rango de temperatura, alta eficiencia de la columna y buena selectividad, especialmente para compuestos como alcanos, alcoholes, cetonas y aromáticos (incluyendo PAHs, PCBs o ésteres de ftalato). El desarrollo y aplicación de nuevas fases estacionarias basadas en FLs para LC

y GC se presenta de manera resumida en una excelente revisión crítica realizada recientemente por Profumo *et al.*<sup>101</sup>.

#### 2.4.1.2. Polímeros de impresión molecular (MIPs):

Los MIPs son materiales sintéticos con sitios de reconocimiento generados artificialmente, capaces de volver a enlazar preferentemente una molécula diana específica sobre otros compuestos estrechamente relacionados. Estos materiales se obtienen por polimerización de monómeros funcionales y reticulantes en torno a una molécula plantilla que sirve como molde, en presencia de un disolvente porogénico adecuado, dando lugar a una red tridimensional de un polímero altamente reticulado<sup>118</sup>. Los monómeros se eligen teniendo en cuenta su capacidad de interactuar con los grupos funcionales de la molécula plantilla. Luego que ha tenido lugar la polimerización, la molécula plantilla se extrae y se establecen sitios de unión con forma, tamaño y funcionalidades complementarias al analito diana (ver figura 2.14.). Los MIPs resultantes son estables, robustos y resistentes a una amplia gama de pH, disolventes y temperatura, por lo que su comportamiento emula las interacciones establecidas por los receptores naturales para retener selectivamente la molécula diana (ejemplo, anticuerpo-antígeno) pero sin las limitaciones de estabilidad asociadas. También es importante señalar que la síntesis de los MIPs es relativamente barata y fácil, convirtiendo los MIPs en una clara alternativa de los receptores naturales<sup>118</sup>.

Los MIPs pueden ser sintetizados fundamentalmente mediante dos enfoques<sup>119</sup>. En el primero se forma el complejo de pre-polimerización, en el cual la molécula plantilla se combina con los monómeros funcionales mediante el uso de enlaces químicos débiles, tales como enlaces de hidrógeno, interacción dipolo-dipolo, fuerzas de van der Waals o por apareamiento iónico. Este método se denomina impresión no covalente. El segundo enfoque se basa en la formación de enlaces covalentes en el complejo monómero funcional-plantilla y se le ha llamado impresión covalente. La selección entre las estrategias mencionadas define el curso de la etapa subsiguiente del proceso, que implica la eliminación de la molécula plantilla de la estructura del polímero.



**Fig. 2.14:** Representación esquemática del proceso de construcción de los polímeros de impresión molecular (MIPs). Para más detalle ver texto.

En el caso de la impresión covalente, la alta estabilidad de la interacción plantilla-monomero conduce a una población bastante homogénea de sitios de unión, reduciendo al mínimo la ocurrencia de los sitios no específicos. Sin embargo, la dificultad en el diseño de un apropiado complejo de plantilla-monomero en el que la formación y la escisión de los enlaces covalentes sean fácilmente reversibles bajo condiciones suaves, hace este enfoque bastante restrictivo<sup>119</sup>. En el caso de la impresión no covalente, el procedimiento experimental es bastante simple y una amplia variedad de monómeros capaces de interactuar con casi cualquier tipo de plantilla están disponibles comercialmente. Este enfoque es, por mucho, el más utilizado para la preparación de MIPs. Sin embargo, no está libre de algunos inconvenientes, que ocurren principalmente porque las interacciones plantilla-monomero se rigen por un proceso de equilibrio. Por lo tanto, con el fin de desplazar el equilibrio hacia la formación del complejo plantilla-monomero, se utiliza una gran cantidad de monómero. En consecuencia, el exceso de monómeros libres se incorpora al azar en la matriz polimérica, lo que lleva a la formación de sitios de unión no selectivos<sup>119</sup>.

Los MIPs se han utilizado ampliamente como materiales de reconocimiento y separación molecular en diferentes campos (por ejemplo sensores, administración de fármacos, cromatografía, reconocimiento de proteínas, separación quiral y pre-tratamiento de muestras)<sup>118-121</sup>. La alta especificidad de los MIPs permite su uso como materiales adsorbentes selectivos en el tratamiento de muestras personalizado antes de la determinación final. Por lo tanto, su uso en SPE, llamada extracción en fase sólida-molecularmente impresa (MI-SPE, del inglés *Molecularly-Imprinted Solid-Phase Extraction*) es, por mucho, la aplicación técnica más avanzada de los MIPs en el área de la química analítica<sup>119-121</sup>. Además, en los últimos años se ha observado un creciente interés en la combinación de los MIPs con otras técnicas de preparación de muestras, por ejemplo las técnicas SPME, extracción por dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD, del inglés *Matrix Solid-Phase Dispersion*) y extracción adsorptiva con barra agitadora (SBSE, siglas del inglés para *Stir Bar Sorptive Extraction*).

En esta sección centraremos la atención en discutir brevemente la aplicación de los MIPs en la etapa del proceso analítico correspondiente a la preparación de muestras, resaltando algunas aplicaciones en el tratamiento de muestras biológicas y ambientales.

**MI-SPE.** La MI-SPE es la aplicación técnica más avanzada de los MIPs. De hecho, algunas empresas ya comercializan cartuchos empacados con MIPs adecuados para la determinación de analitos específicos en diferentes muestras<sup>119</sup>. El primer ejemplo de la aplicación de la MI-SPE en bioanálisis fue reportado por Sällergren<sup>122</sup> para la retención selectiva en línea (“*on-line*”) del fármaco Pentamidina (PAM) en muestras de orina. El polímero retuvo fuertemente al PAM, permitiendo la detección directa del mismo en la etapa de desorción, sin análisis cromatográfico sucesivo. Aunque fue posible cargar muestras de orina, ésta se diluyó con un disolvente orgánico para minimizar el contenido acuoso antes de la carga. La gran complejidad de las muestras biológicas hace que sea necesario optimizar la etapa de lavado cuidadosamente, con el fin de eliminar los compuestos interferentes; en algunos casos, esto conduce a la pérdida simultánea de analito y, por lo tanto, una baja recuperación.

Para mejorar el rendimiento analítico de la MI-SPE se desarrolló la SPE de dos pasos. En ésta, la muestra se limpia en un adsorbente de SPE previo a su introducción en el

adsorbente basado en MIPs. De esta manera, la cantidad de impurezas que llegan a los MIPs es menor y los analitos se cuantifican fácilmente. Además, los analitos se eluyen del primer cartucho con un disolvente orgánico, por lo que alcanzan el cartucho de MIPs en un disolvente adecuado para el reconocimiento selectivo<sup>123</sup>.

Los trabajos anteriormente descritos comprenden la SPE en línea, la cual reduce drásticamente la manipulación de la muestra entre los pasos de preconcentración y el análisis, por lo que la pérdida de analitos y el riesgo de contaminación se reducen y los límites de detección y reproducibilidad mejoran. Además, todo el extracto de la muestra entra en la columna analítica por lo que el volumen de la muestra puede ser reducido, se disminuye el consumo de disolventes orgánicos y se mejora el potencial para la automatización. A pesar de las claras ventajas de la SPE en línea, las aplicaciones están limitadas debido a que el disolvente de elución es la misma fase móvil del sistema cromatográfico, ocurriendo en muchos casos una falta de compatibilidad entre el disolvente necesario para desorber los analitos de la pre-columna de MIPs y la fase móvil necesaria para realizar la separación en la columna analítica.

En los procedimientos fuera de línea (“*off-line*”) la instrumentación requerida es simple y se pueden utilizar condiciones de elución óptimas en la pre-columna de MIPs sin que la instrumentación analítica tenga que ser compatible con el disolvente, el pH, o con los aditivos ácidos o básicos utilizados para la misma. Tal vez por esta razón, la mayoría de aplicaciones MI-SPE reportadas hasta la fecha se han desarrollado fuera de línea. En los últimos años se ha visto un enorme desarrollo en los métodos MI-SPE fuera de línea para la determinación de muchos analitos en muestras ambientales (agua de los ríos, aguas subterráneas, aguas residuales, agua de mar y extractos de suelos), biofluidos (orina, plasma, suero y sangre) y muestras de alimentos<sup>120</sup>.

**Microextracción en MI-SPME.** En SPME el volumen del material adsorbente es generalmente mucho menor que en SPE y el mismo se coloca típicamente sobre la superficie de una fibra de sílice fundida. Sin embargo, sólo unos pocos tipos de recubrimiento están disponibles comercialmente y su selectividad es insuficiente. La utilización de los MIPs como recubrimientos para SPME representa una buena solución. El enfoque MI-SPME fue propuesto por primera vez en 2001<sup>124,125</sup> pero no fue sino hasta el año 2007 cuando se reportó otra investigación similar tratando este tema. Sin embargo, en los últimos ocho años se ha generado un número creciente de trabajos en este campo<sup>118-121</sup>.

**Fibras recubiertas con MIPs.** El recubrimiento de fibras con MIPs es el formato más típico de la MI-SPME, y lo reportó por primera vez Koster *et al.*<sup>124</sup>. En su trabajo, la polimerización se llevó a cabo en la superficie de una fibra de sílice y se obtuvo una capa de revestimiento con un espesor de aproximadamente 75  $\mu\text{m}$ . Sin embargo, el control del espesor del revestimiento, de una manera reproducible, requiere condiciones de preparación juiciosas. Una estrategia de revestimiento múltiple para la preparación de fibras recubiertas con MIPs fue propuesto por Li *et al.*<sup>126</sup> y se utiliza en varios estudios reportados en la literatura<sup>126,127</sup>. En estos trabajos se lograron recubrimientos homogéneos, densos y finos de 1-3  $\mu\text{m}$  de espesor después de cada proceso de recubrimiento. Las fibras obtenidas se sumergen nuevamente en la solución de polimerización fresca, repitiendo varias veces el recubrimiento hasta que se alcanza el espesor deseado.

Alambres de metales sililados (por ejemplo de acero inoxidable<sup>128</sup> y de aluminio<sup>129</sup>) se han recubierto con éxito con MIPs siguiendo procedimientos de revestimiento similares, que hacen a la fibra más estable para el análisis de rutina.

**MI-SPME en tubo.** La SPME en tubo fue desarrollada para la miniaturización, la automatización y el acoplamiento en línea con los instrumentos analíticos. Luego de pasar la muestra repetidamente a través del capilar, los analitos extraídos se desorben con la fase móvil para finalmente analizarlos en línea utilizando la instrumentación analítica respectiva. La MI-SPME en tubo se adecúa de manera similar a la SPME para las determinaciones en línea, pero con una selectividad muy superior. La MI-SPME en tubo fue propuesta por primera vez por Pawliszyn *et al.*<sup>125</sup>. Partículas de MIPs se mezclaron con metanol y se empaquetaron en tubos de poli(éter-éter-cetona) (PEEK, del inglés polyether-ether-ketone) con ambos extremos tapados. De esta manera, se desarrolló un método de extracción de MI-SPME en línea automatizado para la determinación de Propranolol (fármaco utilizado para tratar la presión arterial alta) en fluidos biológicos.

#### 2.4.2. Rol de los NMs inorgánicos en el proceso analítico.

Las NPs inorgánicas abarcan una amplia gama de sustancias, incluyendo metales elementales, óxidos metálicos, óxido de silicio y sales metálicas, que se han utilizado ampliamente en el área de química analítica. Las NPs de plata (AgNPs) se utilizan en muchos productos como bactericidas y como adsorbentes en SPE. Las NPs de oro (AuNPs) se exploran para muchas aplicaciones como adsorbentes en SPE y actividades catalíticas. Ambas NPs de plata y oro poseen los llamados *plasmones superficiales* debido a la oscilación colectiva de los electrones, que les proporcionan excelentes propiedades ópticas y mejoran el campo eléctrico en su superficie, permitiendo su uso en el desarrollo de sensores ópticos y electroquímicos<sup>25</sup>.

Los puntos cuánticos (QDs, siglas del inglés para *Quantum Dots*) son nanocristales semiconductores (por ejemplo, CdS, CdSe, CdTe, ZnSe, etc.) con sus tres dimensiones en el rango de tamaño de 1-10 nm. En muchos aspectos, estos nanocristales luminiscentes constituyen una etapa de transición entre los semiconductores a granel y los átomos individuales, aplicándose principalmente en el desarrollo de sensores y biosensores analíticos<sup>130</sup>.

Las NPs de óxidos metálicos son ampliamente utilizadas como adsorbentes en SPE, como por ejemplo TiO<sub>2</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, ZrO<sub>2</sub>, MnO y CeO<sub>2</sub>, así como NPs de óxidos de hierro (FeOx). Adicionalmente cabe señalar que las NPs magnéticas que han sido sintetizadas con diferentes composiciones y fases, incluyendo óxidos de hierro (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> y  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), metales puros (Fe y Co), ferro-magnetos de tipo espinela, así como aleaciones, cada vez son más usadas en procesos de extracción<sup>131</sup>.

Por otra parte, las NPs de sílice (SiO<sub>2</sub>) se caracterizan por presentar áreas superficiales altas y exhibir reactividad superficial intrínseca que permite su modificación química para su utilización como adsorbentes<sup>132</sup>. Las zeolitas, arcillas y cerámicas nanométricas son otros NMs que se han propuesto para varias aplicaciones analíticas<sup>133</sup>.

NPs metálicas (MNPs, del inglés *Metallic Nano-Particles*) en el proceso analítico: es un

término que implica una amplia gama de diferentes NPs inorgánicas e híbridas inorgánicas/orgánicas, tales como las NPs de metales puros y las NPs de óxidos metálicos. Las MNPs tienen propiedades únicas tales como gran superficie específica, alta capacidad de adsorción y susceptibilidad de modificación a baja temperatura, por lo que son opciones de selección como extractantes en fase sólida, ofreciendo mecanismos de eliminación de contaminantes. Las MNPs también tienen una actividad química relativamente alta la cual les proporciona cierta especificidad en sus interacciones. Las estrategias de inmovilización y aplicaciones analíticas para las NPs de metales y óxidos metálicos han sido discutidas ampliamente en la literatura y críticamente revisadas recientemente<sup>134-136</sup>. En esta sección, presentaremos algunas aplicaciones para ilustrar el potencial de este grupo de NPs con especial énfasis en la preparación de muestras.

#### 2.4.2.1. NPs de metales:

NPs de oro (AuNPs). Las AuNPs son NMs prometedores y fiables debido a su alta relación superficie/volumen, estabilidad a largo plazo, fáciles de sintetizar y compatibilidad con biomoléculas<sup>134</sup>. Las moléculas orgánicas que contienen grupos tiol o amino pueden adsorberse de forma espontánea sobre la superficie de oro para formar una monocapa auto-ensamblada y bien organizada<sup>137</sup>. Las AuNPs inorgánicas o híbridas orgánicas/inorgánicas con propiedades superficiales sintonizables han sido reportadas como excelentes plataformas para una amplia gama de métodos de análisis<sup>135</sup>.

Wang *et al.*<sup>138</sup> propusieron una técnica de SPE modificada, llamada nanoextracción en fase sólida (SPNE, siglas del inglés para *Solid Phase Nano-Extraction*) para la pre-concentración de PAHs en muestras de agua mediante el aprovechamiento de la fuerte afinidad fisico-química entre los PAHs y los coloides de AuNPs. Las AuNPs de 20 nm exhibieron la mejor eficiencia de extracción. Debido a que todo el procedimiento de extracción consume menos de 100  $\mu$ L de disolventes orgánicos por muestra, el método puede ser considerado amigable con el medio ambiente. Los extractos pueden ser analizados ya sea por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)<sup>138</sup> o con técnicas espectroscópicas<sup>139</sup>.

Las extraordinarias propiedades de las AuNPs merecían ser probadas en otros métodos de preparación de muestras, tales como SPME. En tal sentido, Feng *et al.*<sup>140</sup> prepararon una fibra de SPME con AuNPs mediante un método sencillo de auto-ensamblaje capa por capa utilizando un alambre de acero inoxidable como sustrato soporte. La fibra mostró una alta estabilidad y durabilidad frente a ácidos, bases y altas temperaturas, además de una excelente eficacia y selectividad para la extracción de compuestos orgánicos hidrófobos aromáticos en agua de lluvia y extractos de suelos. Finalmente, Karimipour *et al.*<sup>141</sup> sintetizaron un adsorbente de AuNPs soportado sobre carbón activado (AuNP-AC) y modificado con bis(salicilaldehído 4-metoxi)-1,2-fenilendiamina (BMSAPD) para la pre-concentración de pequeñas cantidades de iones de  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  en muestras de agua. Todos los iones metálicos bajo estudio fueron retenidos en el adsorbente AuNP-AC-BMSAPD mediante el acomplejamiento de los mismos con el ligando BMSAPD, proporcionando una manera de preconcentración eficiente. Luego, los iones metálicos retenidos se eluyen del adsorbente con  $\text{HNO}_3$  y se detectan por espectrometría de absorción atómica (FAAS).

NPs de plata (AgNPs): en vista de las propiedades similares de la plata y el oro, las AgPNs se utilizan como recubrimiento de fibras en SPME mediante la técnica de metalización sin electricidad<sup>142</sup>. Este recubrimiento de la fibra tiene una superficie porosa, por lo tanto mayor capacidad de adsorción y eficacia en la extracción. Además, la fibra también tiene una excelente estabilidad y durabilidad frente al tratamiento con ácidos, bases y altas temperaturas. Se demostró que la fibra recubierta de plata exhibe un mejor rendimiento para la extracción de PAHs y ésteres de ftalato, en comparación con las fibras comercialmente disponibles y otras fibras para SPME<sup>142</sup>.

Las AgNPs también han sido utilizadas directamente para la determinación de compuestos orgánicos. La reducción de nitrato de plata con borohidruro de sodio en un medio acuoso en presencia de bromuro de cetil trimetilamonio produce una solución estable de AgNPs que puede adsorber compuestos orgánicos no polares, como los HAPs, en la superficie de las NPs del metal. La posterior determinación luminiscente demostró el efecto sensibilizador de la luminiscencia por parte de las AgNPs. Esta estrategia ha demostrado ser útil para la pre-concentración y análisis directo de trazas de pireno en muestras acuosas<sup>143</sup>.

La modificación superficial con grupos funcionales es un procedimiento básico para evitar la agregación de las AgNPs preparadas, controlar el tamaño de las partículas y también para proporcionar selectividad extra cuando las NPs se utilizan como medios de separación. En este sentido, se desarrolló una técnica de SPE basada en el uso de AgNPs modificadas con Morin como un agente complejante para la pre-concentración de trazas de plomo en muestras biológicas con detección por ETAAS<sup>144</sup>.

#### 2.4.2.2. NPs de óxidos metálicos:

NPs de óxidos metálicos puros: las NPs de óxidos metálicos (MONPs, siglas del inglés para *Metal Oxide Nano-Particles*) tales como TiO<sub>2</sub>, ZnO, ZrO<sub>2</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, y CeO<sub>2</sub>, han sido ampliamente utilizadas para la extracción y separación de especies contaminantes<sup>145-147</sup>. En la mayoría de los casos, estas MONPs fueron utilizadas como adsorbentes en SPE para la separación de iones metálicos tóxicos y compuestos orgánicos. Las MONPs ofrecen propiedades únicas, tales como alta estabilidad térmica, mecánica y química, así como una gran área superficial específica y alta capacidad de adsorción cumpliendo con los requisitos de un adsorbente para SPE.

Se ha reportado el comportamiento de la adsorción de iones metálicos tóxicos como el Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Zn y elementos de tierras raras en NPs de TiO<sub>2</sub><sup>145</sup>. Baytak *et al.*, utilizaron una mini-columna de levadura para inmovilizar NPs de TiO<sub>2</sub> y extraer los elementos tóxicos anteriormente señalados a partir de muestras de agua, analizando los extractos con espectrometría de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente (ICP-AES)<sup>145</sup>. La columna que contenía 100 mg de adsorbente ofreció una capacidad para pre-concentrar hasta 500 mL de solución de muestra, logrando un factor de enriquecimiento de 250 con 2 ml de HNO<sub>3</sub> 5 % (v/v) como eluyente.

Las MONPs también han mostrado un mejor desempeño como adsorbentes respecto a los recubrimientos poliméricos utilizados comúnmente en SPME, en términos de estabilidad química y durabilidad. Además, proporcionan una alta porosidad y gran área superficial, con la consiguiente mejora en la capacidad de extracción. Wang *et al.*<sup>146</sup> fabricaron una nano-



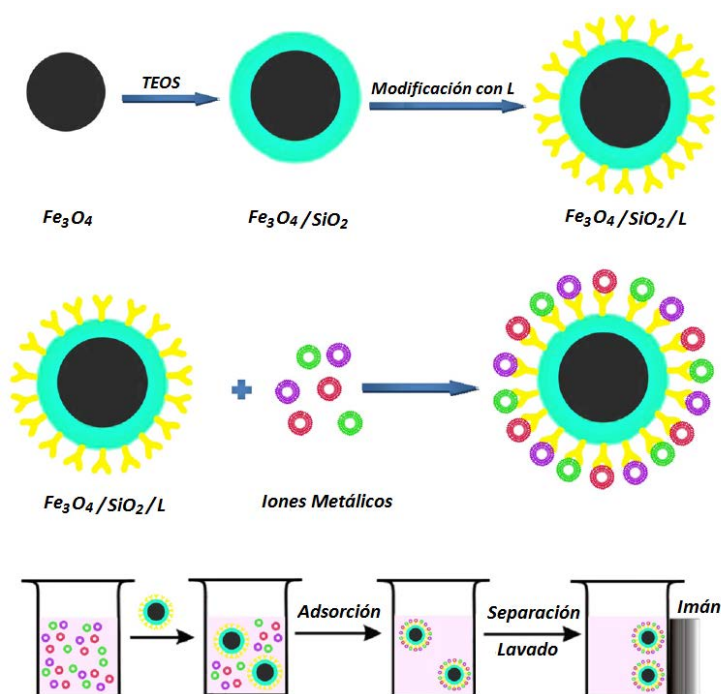
varilla mediante el recubrimiento de una fibra de sílice fundida con un material compuesto de NPs de ZnO y polidimetilsiloxano y la utilizaron para la SPME de benceno, tolueno, etilbenceno y xileno en soluciones acuosas. Ji *et al.*<sup>147</sup> prepararon nanovarillas con recubrimiento basado en ZnO para SPME sobre alambres de acero inoxidable, utilizando un método de *in situ* crecimiento hidrotérmico para la determinación de aldehídos en muestras de fideos instantáneos. El recubrimiento preparado tiene una alta relación superficie/volumen con una longitud de 300-500 nm. La eficacia del revestimiento para la extracción de los cinco aldehídos analizados fue comparable al de una fibra comercial de carboxen/polidimetilsiloxano de 85  $\mu\text{m}$  de espesor, aunque el espesor del revestimiento de la fibra a base de ZnO era de sólo 3-5  $\mu\text{m}$ .

NPs de óxidos metálicos modificados: para mejorar su selectividad, las MONPs se pueden funcionalizar adicionalmente con compuestos pequeños o polímeros orgánicos y/o inorgánicos. En este sentido, Shen *et al.*<sup>148</sup> prepararon nanoperlas con núcleo de ZnO y cubierta de polimetacrilato de metilo (PMMA) como adsorbentes en un novedoso método de SPME utilizando detección mediante Espectrometría de Masas con Ionización Laser y Desorción Asistida por Matriz acoplada a un Analizador de Tiempo de Vuelo (MALDI-TOF-MS, siglas del inglés para *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Fly Mass Spectrometry*). La cubierta de PMMA polimerizó en virtud de los radicales libres pre-existentes en la superficie de las NPs de ZnO. Las nanoperlas de ZnO-PMMA preparadas son muy estables y fáciles de dispersar en solución, mostrando una alta eficiencia para la pre-concentración de péptidos y proteínas.

Por otro lado, nanoalúmina químicamente modificada se ha utilizado para la extracción de diferentes cationes metálicos en agua, alimentos, orina y muestras marinas, con resultados satisfactorios<sup>149,150</sup>. En un excelente trabajo, alúmina recubierta con NPs de azufre se utilizó para extraer eficazmente cantidades traza de iones Cd, Cu, Zn y Pb en muestras marinas<sup>149</sup>. La alúmina recubierta con 2,4-dinitrofenilhidrazina dodecil sulfato de sodio demostró ser un adsorbente eficiente para la extracción de los iones Pb (II), Cd (II), Cr (III), Co (II), Ni (II) y Mn (II) a partir de muestras acuosas<sup>150</sup>.

Extracción en fase sólida magnética (MSPE): se ha introducido para la preparación rápida y fácil de la muestra<sup>134</sup>. Los materiales de adsorción magnéticos se dispersan directamente en la solución de muestra para extraer rápidamente los analitos, ya que se pueden recuperar fácilmente con la ayuda de un imán. La MSPE también supera los problemas asociados a la SPE convencional, tales como el rellenado de las columnas y el proceso de carga de grandes volúmenes de muestras que consume tiempo. Típicamente, el material de adsorción compuesto se construye usualmente con un núcleo de un óxido metálico magnético con o sin modificación química (mayormente  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) el cual permite la recolección por el imán y un agente quelante o NPs que sirven como soporte para extraer los diferentes analitos. Diferentes NPs se han utilizado como material de apoyo para la MSPE, entre ellas quitosano, CNTs, MWCNTs, grafeno,  $\text{TiO}_2$ , alúmina, etc.)<sup>134,135</sup>. La MSPE ha sido utilizada para la determinación de diversos analitos orgánicos e inorgánicos en muestras de aguas, ambientales, alimentos y fluidos biológicos<sup>151,152</sup>. Adicionalmente, esta técnica de extracción ha sido revisada de manera crítica recientemente en la literatura, incluyendo detalles sobre la síntesis, caracterización, usos y aplicaciones analíticas de las NPs magnéticas<sup>134-136,153,154</sup>.

Un buen ejemplo de MSPE lo encontramos en el trabajo desarrollado por Bagheri *et al.*<sup>151</sup>. En el mismo, se describe la preparación y caracterización de un nanocompuesto magnético de magnetita, sílice y una base de Schiff como adsorbente para la pre-concentración y determinación de trazas de iones de metales pesados en agua, alimentos y muestras biológicas, mediante espectrometría de absorción atómica. En este trabajo las NPs de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) fueron recubiertas con una película delgada de sílice, mediante reacción con tetraetoxisilano (TEOS) para conformar el soporte magnético ( $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ ). A continuación, la base de Schiff (L, (3-(4-metoxibenzilidenamino)-2-tioxi-tiazolidina-4-ona)) fue injertada sobre la superficie del soporte magnético ( $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ ) para obtener el material adsorbente funcionalizado ( $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{L}$ ). Las partículas funcionalizadas fueron agregadas a una solución acuosa que contenía los iones de los metales pesados (Pb(II), Cd(II) y Cu(II)) para su adsorción mediante quelación en la superficie de las partículas. Seguidamente, las partículas conteniendo los metales fueron separadas del seno de la solución con la ayuda de un imán y lavadas para finalmente re-disolver los iones de los metales con  $\text{HNO}_3$  para su determinación mediante FAAS. En la figura 2.15, se representa esquemáticamente el proceso de MSPE anteriormente descrito.



**Fig. 2.15:** Representación esquemática del proceso de formación de NPs magnéticas adsorbentes y del proceso de MSPE. Para más detalle ver texto. Figura adaptada de Bagheri *et al.*<sup>151</sup>.

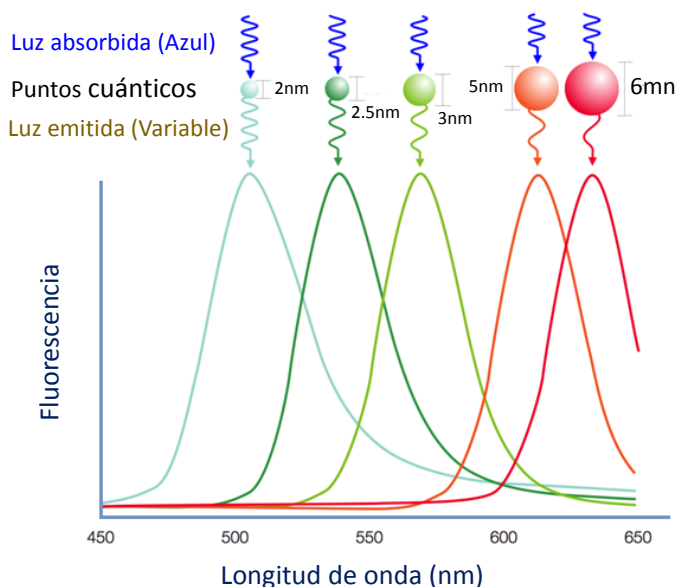
### Puntos cuánticos:

Los QDs son materiales nanoestructurados, también conocidos como materiales cero-dimensionales o nanocristales semiconductores. Estos semiconductores nanocristalinos coloidales están formados por elementos de los grupos II-VI, III-V o IV-VI de la tabla periódica, son más o menos esféricos y con tamaños típicamente en el rango de 1 a 12 nm de diámetro. En esos tamaños reducidos (cerca o más pequeños que las dimensiones del radio

de Bohr de un excitón en el material a granel correspondiente) estas NPs se comportan de manera diferente a los sólidos a granel debido a efectos de confinamiento cuánticos<sup>155</sup>. El confinamiento cuántico es responsable de las notables propiedades optoelectrónicas atractivas exhibidas por los QDs, incluidos sus altos rendimientos cuánticos de emisión, perfiles de emisión sintonizables por tamaño y bandas espectrales estrechas<sup>156</sup>. Por otra parte, la fuerte dependencia de sus propiedades con el tamaño da como resultado una emisión sintonizable que conduce cada día a nuevas aplicaciones. Tal y como lo señalamos anteriormente, los QDs pueden sintetizarse con átomos de los grupos II-VI, III-V o IV-VI, lo que permite una gran variedad de QDs. Sin embargo, la mayoría de las aplicaciones de los QDs ha puesto su énfasis en materiales tales como CdSe, CdTe, ZnSe, CdS, CdSe/ZnS, InP, etc.<sup>157,158</sup>. Estos NMs se obtienen mediante distintas rutas de síntesis que garantizan un control estricto de la materia constitutiva, el tamaño, la forma y la composición química de su superficie<sup>214</sup>. Entre los diferentes procesos físicos y químicos para la preparación de los QDs, el método de la química coloidal es la mejor ruta para sintetizar nanocristales con la adecuada funcionalidad de la su superficie, la cual les proporciona una alta eficiencia luminiscente, estrecha distribución de tamaños y especificidad para interactuar con determinadas especies<sup>157</sup>. Además, dado que los QDs se dispersan en un disolvente, deben ser estabilizados para evitar su aglomeración. Por consiguiente, la posibilidad de modificar la superficie de los QDs con ligandos adecuados es un aspecto de importancia primordial que afecta no sólo las propiedades de la solución y la solubilidad de los nanocristales, sino también a su uso potencial como sensores químicos<sup>158</sup>.

Los recientes avances en la nanotecnología de los QDs han introducido poco a poco a estos NMs en el área de química analítica, sobre todo como sensores químicos en mediciones basadas en fluorescencia<sup>12,158-160</sup>. Debido al pequeño tamaño y a la alta relación superficie/volumen de los QDs, la composición de su superficie es determinante, así como cualquier modificación del medio circundante o la interacción con otras especies químicas, la cual podría ser modulada a distintos niveles, dando lugar a una alteración significativa de las propiedades foto-luminiscentes, es decir, en términos de la intensidad de emisión, corrimiento espectral o un cambio en el tiempo de decaimiento<sup>158</sup>. Desde un punto de vista analítico, la modulación de la luminiscencia de los QDs como una respuesta selectiva a un analito dado puede ser percibida por diferentes medios: a) incremento o supresión de la intensidad de la fluorescencia, b) FRET, c) incremento o supresión directa o indirecta de la quimioluminiscencia y d) transferencia resonante de energía en la quimioluminiscencia (CRET, siglas del inglés para *Chemiluminescence Resonance Energy Transfer*)<sup>158-160</sup>.

La dependencia de la longitud de onda de luz emitida por los nanocristales con el tamaño de los mismos durante los procesos luminiscentes es probablemente la propiedad óptica más llamativa y más estudiada de los QDs. En este sentido, se sabe que las propiedades de emisión de nanocristales semiconductores dependen en gran medida de la energía y la densidad de los estados electrónicos, los cuales pueden ser alterados mediante la variación del tamaño y la forma de estas diminutas estructuras. Por ejemplo, la figura 2.16 muestra los espectros de fluorescencia para QDs de CdSe con diferentes tamaños de diámetro de NPs. Como puede verse, la longitud de onda de la luz emitida por los nanocristales de CdSe de diferentes tamaños se puede sintonizar en el intervalo de 480 a 680 nm. Además, como cada material tiene diferentes límites de tonalidad, que dependen de las limitaciones físicas del



**Fig. 2.16:** Espectros de fluorescencia de nanocristales de CdSe de diferentes tamaños. Para más detalle ver texto.

tamaño del punto, se han empleado otros materiales en la síntesis de QDs para cubrir otras regiones del espectro ( QDs basados en Zn emiten por debajo de 400 nm mientras que los QDs basados en Pb tienen una emisión en la región espectral del infrarrojo cercano)<sup>12</sup>.

Como resultado de su estructura electrónica discreta, parecida a la de un átomo, los QDs tienen espectros de emisión típicamente muy estrechos, con anchura total a la mitad del máximo de la emisión luminiscente de alrededor de 15-40 nm<sup>12,158</sup>. Dado que las líneas de emisión son comparativamente mucho más estrechas que las de ligandos orgánicos, la detección de los QDs sufre mucho menor diafonía de la que pudiera resultar por la emisión de un fluoróforo diferente alojado en el canal de detección del fluoróforo de interés (analito).

Por otro lado, los QDs suelen exhibir rendimientos cuánticos de fluorescencia más altos que los fluoróforos orgánicos convencionales, permitiendo una mayor sensibilidad analítica. Esto se logra mediante la modificación química de la superficie, que permite que los mecanismos de desactivación radiantes (emisión de luz) predominen sobre los mecanismos de desactivación no radiantes. En este contexto, por ejemplo, se ha demostrado que el recubrimiento de los nanocristales de CdSe con una capa de un semiconductor inorgánico de banda ancha (por ejemplo, ZnS) reduce la desactivación no radiante y da como resultado una emisión más brillante<sup>161</sup>.

Por razones de espacio en el alcance del presente capítulo, no incluiremos ejemplos puntuales sobre la aplicación de los QDs en determinaciones analíticas particulares, sin embargo, se encuentran disponibles varias revisiones críticas sobre la materia, donde los lectores interesados podrán encontrar múltiples ejemplos relacionados con la aplicación de los QDs en el desarrollo de sensores y biosensores ópticos para la determinación de diversos analitos en diferentes matrices<sup>12,158-160</sup>.

---

**Referencias**

1. M Valcárcel, BM Simonet, S Cárdena. Analytical nanoscience and nanotechnology today and tomorrow. **Anal. Bioanal. Chem.**, **391**, 1881-1887 (2008).
2. M Valcárcel, BM Simonet. Nanomaterials for improved analytical processes **Anal. Bioanal. Chem.**, **399**, 1-2 (2011).
3. H Yin, K Killeen, R Brennen, D Sobek, M Werlich, T van de Goor. Microfluidic chip for peptide analysis with an integrated HPLC column, sample enrichment column, and nanoelectrospray tip. **Anal. Chem.**, **77**, 527-533 (2005).
4. N Leopold, M Haberkorn, T Laurell, J Nilsson, JR Baena, B Lendl. On-line monitoring of airborne chemistry in levitated nanodroplets: In situ synthesis and application of sers-active Ag-sols for trace analysis by FT-Raman spectroscopy. **Anal. Chem.**, **75**, 2166-2171 (2003).
5. J Riu, A Maroto, FX Rius. Nanosensors in environmental analysis. **Talanta**, **69**, 288-301 (2006).
6. X Shi, W Gu, B Li, N Chen, K Zhao, Y Xian. Enzymatic biosensors based on the use of metal oxide nanoparticles. **Microchim. Acta**, **181**, 1-22 (2014).
7. AJ Haes, RP Van Duyne. A unified view of propagating and localized surface plasmon resonance biosensors. **Anal. Bioanal. Chem.**, **379**, 920-930 (2004).
8. JC Riboh, AJ Haes, AD McFarland, CR Yonzon, RP Van Duyne. A nanoscale optical biosensor: Real-time immunoassay in physiological buffer enabled by improved nanoparticle adhesion. **J. Phys. Chem. B**, **107**, 1772-1780 (2003).
9. A Fujiwara, K Ishii, H Suematsu, H Kataura, Y Maniwa, S Suzuki, Y Achiba. Gas adsorption in the inside and outside of single-walled carbon nanotubes. **Chem. Phys. Lett.**, **336**, 205-211 (2001).
10. OK Varghese, PD Kichambre, D Gong, KG Ong, EC Dickey, CA Grimes. Gas sensing characteristics of multi-wall carbon nanotubes. **Sens. Actuators B**, **81**, 32-41 (2001).
11. F Favier, EC Walter, MP Zach, T Benter, RM Penner. Hydrogen sensors and switches from electro-deposited palladium mesowire arrays **Science** **293**, 2227-2231 (2001).
12. VS Lin, K Moteshareh, KS Dancil, MJ Sailor, MR Ghadiri. A porous silicon-based optical interferometric biosensor. **Science**, **278**, 840-843 (1997).
13. LG Carrascosa, M Moreno, M Álvarez, LM Lechuga. Nanomechanical biosensors: a new sensing tool. **TraC Trends Anal. Chem.**, **25**, 196-209 (2006).
14. NV Lavrik, PG Datskos. Femtogram mass detection using photothermally actuated nanomechanical resonators. **Appl. Phys. Lett.**, **82**, 2697-2699 (2003).
15. W Jiang, E Papa, H Fischer, S Mardiyani, WCW Chan. Semiconductor quantum dots as contrast agents for whole animal imaging. **Trends Biotechnol.**, **22**, 607-609 (2004).
16. AJ Baeumner, RN Cohen, V Miksic, J Min. RNA biosensor for the rapid detection of viable *Escherichia coli* in drinking water. **Biosens. Bioelectron.**, **18**, 405-413 (2003).
17. PJ Britto, KSV Santhanam, PM Ajayan. Carbon nanotube electrode for oxidation of dopamine. **Bioelectrochem. Bioenerg.**, **41**, 121-125 (1996).
18. Y Zhang, L Lin, Z Feng, J Zhou, Z Lin. Fabrication of a PANI/Au nanocomposite modified nanoelectrode for sensitive dopamine nanosensor design. **Electrochim. Acta**, **55**, 265-270 (2009).
19. B Bhushan, T Kasai, CV Nguyen, M Meyyappan. Multiwalled carbon nanotube AFM probes for surface characterization of micro/nanostructures. **Microsyst. Technol.**, **10**, 633-639 (2004).
20. H Boo, RA Jeong, S Park, KS Kim, KH Am, YH Lee, JH Han, HC Kim, TD Chung. Electrochemical nanoneedle biosensor based on multiwall carbon nanotube. **Anal. Chem.**, **78**, 617-620 (2006).

21. A Burns, H Ow, U Wiesner. Fluorescent core-shell silica nanoparticles: towards “lab on a particle” architectures for nanobiotechnology. **Chem. Soc. Rev.**, **35**, 1028-1042 (2006).
22. AB Descalzo, R Martínez-Mañez, F Sancenon, K Hoffmann, K Rurack. The supramolecular chemistry of organic-inorganic hybrid materials. **Angew. Chem. Int. Ed.**, **45**, 5924-5948 (2006).
23. NK Mal, M Fujiwara, Y Tanaka. Photocontrolled reversible release of guest molecules from coumarin-modified mesoporous silica. **Nature**, **421**, 350-353 (2003).
24. CT Kresge, ME Leonowicz, WJ Roth, JC Vartuli, JS Beck, Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism. **Nature**, **359**, 710-712 (1992).
25. AI López-Lorente. Contribuciones analíticas a la caracterización y determinación de nanopartículas. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. Córdoba, España (2014).
26. AI López-Lorente, BM Simonet, M Valcárcel. Analytical potential of hybrid nanoparticles. **Anal. Bioanal. Chem.**, **399**, 43-54 (2011).
27. BT Zhang, X Zheng, HF Li, JM Lin. Application of carbon-based nanomaterials in sample preparation: A review. **Anal. Chim. Acta**, **784**, 1-17 (2013).
28. S Iijima. Helical microtubules of graphitic carbon. **Nature**. **354**, 56-58 (1991).
29. H Dai, EW Wong, CM Lieber. Probing electrical transport in nanomaterials: conductivity of individual carbon nanotubes. **Science**, **272**, 523-526 (1996).
30. M Valcárcel, S Cárdenas, BM Simonet, Y Moliner-Martínez, R Lucena. Carbon nanostructures as sorbent materials in analytical processes. **TraC Trends Anal. Chem.**, **27**, 34-43 (2008).
31. M Valcárcel, S Cárdenas, BM Simonet. Role of carbon nanotubes in analytical science. **Anal. Chem.**, **79**, 4788-4797 (2007).
32. M Trojanowicz. Analytical applications of carbon nanotubes: A review. **TraC Trends Anal. Chem.**, **25**, 480-489 (2006).
33. K Scida, PW Stege, G Haby, GA Messina, CD García. Recent applications of carbon-based nanomaterials in analytical chemistry: Critical review. **Anal. Chim. Acta**, **691**, 6-17 (2011).
34. C Herrero-Latorre, J Álvarez-Méndez, J Barciela-García, S García-Martín, RM Peña-Crecente. Carbon nanotubes as solid-phase extraction sorbents prior to atomic spectrometric determination of metal species: A review. **Anal. Chim. Acta**, **749**, 16-35 (2012).
35. Y Cai, G Jiang, J Liu, Q Zhou. Multiwalled carbon nanotubes as a solid-phase extraction adsorbent for the determination of bisphenol A, 4-*n*-nonylphenol, and 4-*tert*-octylphenol. **Anal. Chem.**, **75**, 2517-2521 (2003).
36. LM Ravelo-Pérez, AV Herrera-Herrera, J Hernández-Borges, MÁ Rodríguez-Delgado. Carbon nanotubes: Solid-phase extraction. **J. Chromatogr. A**, **1217**, 2618-2641 (2010).
37. AV Herrera-Herrera, MA González-Curbelo, J Hernández-Borges, MÁ Rodríguez-Delgado. Carbon nanotubes applications in separation science: A review. **Anal. Chim. Acta**, **734**, 1-30 (2012).
38. K Pyrzynska. Carbon nanotubes as sorbents in the analysis of pesticides. **Chemosphere**, **83**, 1407-1413 (2011).
39. R Sitko, B Zawisza, E Malicka. Modification of carbon nanotubes for preconcentration, separation and determination of trace-metal ions. **TraC Trends Anal. Chem.**, **37**, 22-31 (2012).
40. CM Hussain, S Mitra. Micropreconcentration units based on carbon nanotubes (CNT). **Anal. Bioanal. Chem.**, **399**, 75-89 (2011).
41. A El-Sheikh. Effect of oxidation of activated carbon on its enrichment efficiency of metal ions- Comparison with oxidized and non-oxidized multi-walled carbon nanotubes. **Talanta**, **75**, 127-134 (2008).

42. CL Choong, JS Bendall, WI Milne. Carbon nanotube array: A new MIP platform. **Biosens. Bioelectron.**, **25**, 652–656 (2009).
43. KS Hasheminasab, AR Fakhari. Development and application of carbon nanotubes assisted electro-membrane extraction (CNTs/EME) for the determination of buprenorphine as a model of basic drugs from urine samples. **Anal. Chim. Acta**, **767**, 75–80 (2013).
44. Q Li, D Yuan. Evaluation of multi-walled carbon nanotubes as gas chromatographic column packing. **J. Chromatogr. A**, **1003**, 203–209 (2003).
45. C Carrillo-Carrión, R Lucena, S Cárdenas, M Valcarcel. Surfactant-coated carbon nanotubes as pseudophases in liquid–liquid extraction. **Analyst**, **132**, 551–559 (2007).
46. C Saridara, S Mitra. Chromatography on self-assembled carbon nanotubes. **Anal. Chem.**, **77**, 7094–7097 (2005).
47. Y Li, Y Chen, R Xiang, D Ciuparu, LD Pfefferle, C Horvath, JA Wilkins. Incorporation of single-wall carbon nanotubes into an organic polymer monolithic stationary phase for  $\mu$ -HPLC and capillary electrochromatography. **Anal. Chem.**, **77**, 1398–1406 (2005).
48. E Menna, F Della-Negra, M Prato, N Tagmatarchis, A Ciogli, F Gasparrini, D Misita, C Villani. Carbon nanotubes on HPLC silica microspheres. **Carbon**, **44**, 1609–1613 (2006).
49. B. Suárez, B.M. Simonet, S. Cárdenas, M. Valcárcel. Surfactant-coated single-walled carbon nanotubes as a novel pseudostationary phase in capillary EKC. **Electrophoresis**, **28**, 1714–1722 (2007).
50. G Liu, Y Lin. Biosensor based on self-assembling acetylcholinesterase on carbon nanotubes for flow injection/amperometric detection of organophosphate pesticides and nerve agents. **Anal. Chem.**, **78**, 835–843 (2006).
51. H Luo, Z Shi, N Li, Z Gu, Q Zhuang. Investigation of the electrochemical and electrocatalytic behavior of single-wall carbon nanotube film on a glassy carbon electrode. **Anal. Chem.**, **73**, 915–920 (2001).
52. F Valentini, A Amine, S Orlanducci, ML Terranova, G Paleschi. Carbon nanotube purification: Preparation and characterization of carbon nanotube paste electrodes. **Anal. Chem.**, **75**, 5413–5421 (2003).
53. S Hrapovic, E Majid, Y Liu, K Male, JHT Luong. Metallic nanoparticle–carbon nanotube composites for electrochemical determination of explosive nitroaromatic compounds. **Anal. Chem.**, **78**, 5504–5512 (2006).
54. J Wang. Carbon-nanotube based electrochemical biosensors: A review. **Electroanalysis**, **17**, 7–14 (2005).
55. S Kumar, W Ahlawat, R Kumar, N Dillbaghi. Graphene, carbon nanotubes, zinc oxide and gold as elite nanomaterials for fabrication of biosensors for healthcare. **Biosens. Bioelectron.** Aceptado (2015) <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2015.03.062>.
56. J Wang, G Chen, MP Chatrathi, MM usameh. Capillary electrophoresis microchip with a carbon nanotube-modified electrochemical detector. **Anal. Chem.**, **76**, 298–302 (2004).
57. RS Chen, WH Huang, H Tong, ZL Wang, JK Cheng. Carbon fiber nanoelectrodes modified by single-walled carbon nanotubes. **Anal. Chem.**, **75**, 6341–6345 (2003).
58. JK Campbell, L Sun, RM Crooks. Electrochemistry using single carbon nanotubes. **J. Am. Chem. Soc.**, **121**, 3779–3780 (1999).
59. LM Dai, P Soundarajan, T Kim. Sensors and sensor arrays based on conjugated polymers and carbon nanotubes. **Pure Appl. Chem.** **74**, 1753–1772 (2002).
60. H Dai. Carbon nanotubes: opportunities and challenges. **Surf. Sci.**, **500**, 218–241 (2002).
61. JH Hafner, CL Cheung, CM Lieber. Growth of nanotubes for probe microscopy tips. **Nature**, **398**, 761–762 (1999).
62. G Zhao, J Zhang, Q Xhang, H Zhan, O Zhou, LC Oin. Fabrication and characterization of single carbon

- nanotube emitters as point electron sources. **Appl. Phys. Lett.**, **89**, 193113/1-193113/3 (2006).
63. KS Novoselov, AK Geim, SV Morozov, D Jiang, Y Zhang, SV Dubonos, IV Grigorieva, AA Firsov, Electric field effect in atomically thin carbon films. **Science**, **306**, 666–669 (2004).
  64. KS Novoselov, VI Fal'ko, L Colombo, PR Gellert, MG Schwab, K Kim. A roadmap for grapheme. **Nature**, **490**, 192–200 (2012).
  65. M Pumera, A Ambrosi, A Bonanni, ELK Chng, HL Poh. Graphene for electrochemical sensing and biosensing. **TraC Trends Anal. Chem.**, **29**, 954–965 (2010).
  66. J Bai, Y Huang. Fabrication and electrical properties of graphene nanoribbons. **Mater. Sci. Eng. R**, **70** 341–353 (2010).
  67. X Li, W Cai, J An, S Kim, J Nah, D Yang, R Piner, A Velamakanni, I Jung, E Tutuc, SK Banerjee, L Colombo, RS Ruoff. Large-area synthesis of high-quality and uniform graphene films on copper foils. **Science**, **324**, 1312–1314 (2009).
  68. S Bae, H Kim, Y Lee, X Xu, JS Park, Y Zheng, J Balakrishnan, T Lei, HR Kim, Y Song, YJ Kim, KS Kim, B Özyilmaz, JH Ahn, BH Hong, S Iijima. Roll-to-roll production of 30-inch graphene films for transparent electrodes. **Nature Nanotechnol.**, **5**, 574–578 (2010).
  69. PK Ang, S Wang, Q Bao, JTL Thong, KP Loh. High-throughput synthesis of graphene by intercalation–exfoliation of graphite oxide and study of ionic screening in graphene transistor. **ACS Nano**, **3**, 3587–3594 (2009).
  70. Q Liu, J Shi, L Zeng, T Wang, Y Cai, G Jiang. Evaluation of graphene as an advantageous adsorbent for solid-phase extraction with chlorophenols as model analytes. **J. Chromatogr. A**, **1218**, 197–204 (2011).
  71. Q Chang, S Song, Y Wang, J Li, J Ma. Application of graphene as a sorbent for preconcentration and determination of trace amounts of chromium(III) in water samples by flame atomic absorption spectrometry. **Anal. Methods**, **4**, 1110–1116 (2012).
  72. Y Wang, S Gao, X Zang, J Li, J Ma. Graphene-based solid-phase extraction combined with flame atomic absorption spectrometry for a sensitive determination of trace amounts of lead in environmental water and vegetable samples. **Anal. Chim. Acta**, **716**, 112–118 (2012).
  73. KJ Huang, QS Jing, CY Wei, YY Wu. Spectrofluorimetric determination of glutathione in human plasma by solid-phase extraction using graphene as adsorbent. **Spectrochim. Acta A**, **79**, 1860–1865 (2011).
  74. KJ Huang, S Yu, J Li, ZW Wu, CY Wei. Extraction of neurotransmitters from rat brain using graphene as a solid-phase sorbent, and their fluorescent detection by HPLC. **Microchim. Acta**, **176**, 327–335 (2012).
  75. Q Liu, J Shi, G Jiang. Application of graphene in analytical sample preparation. **TraC Trends Anal. Chem.**, **37**, 1–11 (2012).
  76. Q Liu, J Shi, J Sun, T Wang, L Zeng, G Jiang. Graphene and graphene oxide sheets supported on silica as versatile and high-performance adsorbents for solid-phase extraction. **Angew. Chem. Int. Ed.**, **50**, 5913–5917 (2011).
  77. L Chen, T Wang, J Tong. Application of derivatized magnetic materials to the separation and the preconcentration of pollutants in water samples. **TraC Trends Anal. Chem.**, **30**, 1095–1108 (2011).
  78. Q Wu, M Liu, X Ma, W Wang, C Wang, X Zang, Z Wang. Extraction of phthalate esters from water and beverages using a graphene-based magnetic nanocomposite prior to their determination by HPLC. **Microchim. Acta**, **177**, 23–30 (2012).
  79. G Zhao, S Song, C Wang, Q Wu, Z Wang. Determination of triazine herbicides in environmental water samples by high-performance liquid chromatography using graphene-coated magnetic nanoparticles as adsorbent. **Anal. Chim. Acta**, **708**, 155–159 (2011).
  80. Q Wu, G Zhao, C Feng, C Wang, Z Wang. Preparation of a graphene-based magnetic nanocomposite for



- the extraction of carbamate pesticides from environmental water samples. **J. Chromatogr. A**, **1218**, 7936–7942 (2011).
81. W Wang, X Ma, Q Wu, C Wang, X Zang, Z Wang. The use of graphene-based magnetic nanoparticles as adsorbent for the extraction of triazole fungicides from environmental water. **J. Sep. Sci.**, **35**, (2012) 2266–2272 (2012).
  82. CL Arthur, J Pawliszyn. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. **Anal. Chem.**, **62**, 2145–2148 (1990).
  83. J Chen, J Zou, J Zeng, X Song, J Ji, Y Wang, J Ha, X Chen. Preparation and evaluation of graphene-coated solid-phase microextraction fiber. **Anal. Chim. Acta**, **678**, 44–49 (2010).
  84. S Guo, S Dong. Graphene nanosheet: synthesis, molecular engineering, thin film, hybrids, and energy and analytical applications. **Chem. Soc. Rev.**, **40**, 2644–2672 (2011).
  85. NG Shang, P Papakonstantinou, M McMullan, M Chu, A Stamboulis, A Potenza, SS Dhesi, H Marchetto. Catalyst-free efficient growth, orientation and biosensing properties of multilayer graphene nanoflake films with sharp edge planes. **Adv. Funct. Mater.**, **18**, 3506–3514 (2008).
  86. M Zhou, Y Zhai, S Dong. Electrochemical Sensing and Biosensing Platform Based on Chemically Reduced Graphene Oxide. **Anal. Chem.**, **81**, 5603–5613 (2009).
  87. Y Wang, Y Li, L Tang, J Lu, J Li. Application of graphene-modified electrode for selective detection of dopamine. **Electrochem. Commun.**, **11**, 889–892 (2009).
  88. J Li, S Guo, Y Zhai, E Wang. Nafion–graphene nanocomposite film as enhanced sensing platform for ultrasensitive determination of cadmium. **Electrochem. Commun.**, **11**, 1085–1088 (2009).
  89. J Li, S Guo, Y Zhai, E Wang. High-sensitivity determination of lead and cadmium based on the Nafion-graphene composite film. **Anal. Chim. Acta**, **649**, 196–201 (2009).
  90. C Fu, W Yang, X Chen, DG Evans. Direct electrochemistry of glucose oxidase on a graphite nanosheet–Nafion composite film modified electrode. **Electrochem. Commun.**, **11**, 997–1000 (2009).
  91. X Zuo, S He, D Li, C Peng, Q Huang, S Song, C Fan. Graphene oxide-facilitated electron transfer of metalloproteins at electrode surfaces. **Langmuir**, **26**, 1936–1939 (2010).
  92. RS Swathi, KL Sebastian. Resonance energy transfer from a dye molecule to graphene. **J. Chem. Phys.**, **129**, 054703-1–054703-9 (2008).
  93. J Wen, Y Xu, H Li, A Lu, S Sun. Recent applications of carbon nanomaterials in fluorescence biosensing and bioimaging. *Chem. Commun.* (2015). DOI: 10.1039/C5CC02887F.
  94. S Benitez-Martínez, M Valcárcel. Graphene quantum dots in analytical science. **TraC Trends Anal. Chem.**, **72**, 93–113 (2015).
  95. M Bacon, SJ Bradley, T Nann. Graphene quantum dots. **Part. Part. Syst. Charact.**, **31**, 415–428 (2014).
  96. L Li, X Yan. Colloidal graphene quantum dots. **J. Phys. Chem. Lett.**, **1**, 2572–2576 (2010).
  97. CH Lu, HH Yang, CL Zhu, X Chen, GN Chen. A graphene platform for sensing biomolecules. **Angew. Chem. Int. Ed.**, **48**, 4785–4787 (2009).
  98. L Li, L Li, C Wang, K Liu, R Zhu, H Qiang, Y Lin. Synthesis of nitrogen-doped and amino acid-functionalized graphene quantum dots from glycine, and their application to the fluorometric determination of ferric ion. **Microchim. Acta**, **182**, 763–770 (2015).
  99. S Li, Y Li, J Cao, J Zhu, L Fan, X Li. Sulfur-doped graphene quantum dots as a novel fluorescent probe for highly selective and sensitive detection of Fe<sup>3+</sup>. **Anal. Chem.**, **86**, 10201–10207 (2014).
  100. HW Kroto, JR Heath, SC O'brien, RF Curl, RE Smalley. C<sub>60</sub>: Buckminsterfullerene. **Nature**, **318**, 162–163 (1985).

101. A Speltini, D Merli, A Profumo. Analytical application of carbon nanotubes, fullerenes and nanodiamonds in nanomaterials-based chromatographic stationary phases: A review. **Anal. Chim. Acta**, **783**, 1–16 (2013).
102. JR Baena, M Gallego, M Valcárcel. Fullerenes in the analytical sciences. **TraC Trends Anal. Chem.**, **21**, 187-198 (2002).
103. M Gallego, YP De Peña, M Valcárcel. Fullerenes as sorbent materials for metal preconcentration. **Anal. Chem.**, **66**, 4074–4078 (1994).
104. JR Baena, M Gallego, M Valcárcel. Speciation of lead in environmental waters by preconcentration on a new fullerene derivative. **Anal. Chem.**, **74**, 1519–1524. (2002).
105. YP De Peña, M Gallego, M Valcárcel. Preconcentration of copper traces on C<sub>60</sub>-C<sub>70</sub> fullerenes by formation of ion pairs and chelates. **Anal. Chem.**, **67**, 2524–2529 (1995).
106. YP De Peña, M Gallego, M Valcárcel. Fullerene: A sensitive and selective sorbent for the continuous preconcentration and atomic absorption determination of cadmium. **J. Anal. At. Spectrom.**, **12**, 453–457 (1997).
107. J Muñoz, M Gallego, M Valcárcel. Solid-phase extraction–gas chromatography–mass spectrometry using a fullerene sorbent for the determination of inorganic mercury(II), methylmercury(I) and ethylmercury(I) in surface waters at sub-ng/ml levels. **J. Chromatogr. A**, **1055**, 185–190 (2004).
108. E Ballesteros, M Gallego, M Valcárcel. Analytical potential of fullerene as adsorbent for organic and organometallic compounds from aqueous solutions. **J. Chromatogr. A**, **869**, 101–110 (2000).
109. J Muñoz, JR Baena, M Gallego, M Valcárcel. Development of a method for the determination of inorganic cadmium and cadmium metallothioneins in fish liver by continuous preconcentration on fullerene and flame atomic absorption spectrometry. **J. Anal. At. Spectrom.**, **17**, 716–720 (2002).
110. A Serrano, M Gallego. Fullerenes as sorbent materials for benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene isomers preconcentration. **J. Sep. Sci.**, **29**, 33–40 (2006).
111. K Jinno, K Yamamoto, T Ueda, H Nagashima, K Itoh, JC Fetzer, WR Biggs. Liquid chromatographic separation of all-carbon molecules C<sub>60</sub> and C<sub>70</sub> with multi-legged phenyl group bonded silica phases. **J. Chromatogr. A**, **594**, 105-109 (1992).
112. K Jinno, K Yamamoto, JC Fetzer, WR Biggs. C<sub>60</sub> as a stationary phase for microcolumn liquid chromatographic separation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **J. Microcol. Sep.**, **4**, 187–190 (1992).
113. K Jinno, K Fukuoka, JC Fetzer, WR Biggs. Buckminsterfullerene as a stationary phase in liquid chromatography. **J. Microcol. Sep.**, **5**, 517-523 (1993).
114. DL Stalling, C Guo, KC Kuo, S Saim, Fullerene-linked particles as LC chromatographic media and modification of their electron donor/acceptor properties by secondary chemical reactions. **J. Microcol. Sep.**, **5**, 223–235 (1993).
115. RV Golovnya, MB Terenina, EL Ruchkina, VL Karnatsevich. Fullerene C<sub>60</sub> as a new stationary phase in capillary gas chromatography. **Mendeleev. Commun.**, **3**, 231-233 (1993).
116. A Glausch, A Hirsch, I Lamparth, V Schurig. Retention behaviour of polychlorinated biphenyls on polysiloxane-anchored C<sub>60</sub> in gas chromatography. **J. Chromatogr. A**, **809**, 252-257 (1998).
117. YY Chen, PF Fang, ZR Zeng, JH Fan. Synthesis of linear fullerene-containing polysiloxanes and their application to capillary gas chromatography. **Chem. Lett.**, **28**, 499-500 (1999).
118. P Szatkowska, M Koba, P Koslinski, M Szablewski. Molecularly imprinted polymers' applications: A short review. **Mini-Rev. Org. Chem.**, **10**, 400-408 (2013).
119. A Martín-Esteban. Molecularly-imprinted polymers as a versatile, highly selective tool in sample preparation. **TraC Trends Anal. Chem.**, **45**, 169-181 (2013).
120. Yuling Hu, Jialiang Pan, Kaige Zhang, Haixian Lian, Gongke Li. Novel applications of molecularly

- imprinted polymers in sample preparation. **TraC Trends Anal. Chem.**, **43**, 37-52 (2013).
121. ACB Dias, EC Figueiredo, V Grassi, EAG Zagatto, MAZ Arruda. Molecularly imprinted polymer as a solid phase extractor in flow analysis. **Talanta**, **76**, 988–996 (2008).
  122. B Sellaergren, Direct drug determination by selective sample enrichment on an imprinted polymer. **Anal. Chem.**, **66**, 1578-1582 (1994).
  123. WM Mullett, M Walles, K Levsen, J Borlak, J Pawliszyn. Multidimensional on-line sample preparation of verapamil and its metabolites by a molecularly imprinted polymer coupled to liquid chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr.*, B 801, 297-306 (2004).
  124. EHM Koster, C Crescenzi, W den Hoedt, K Ensing, GJ Jong. Fibers coated with molecularly imprinted polymers for solid-phase microextraction. **Anal. Chem.**, **73**, 3140-3145 (2001).
  125. WM Mullett, P Martin, J Pawliszyn. In-tube molecularly imprinted polymer solid-phase microextraction for the selective determination of propranolol. **Anal. Chem.**, **73**, 2383-2389 (2001).
  126. XG Hu, YL Hu, GK Li. Development of novel molecularly imprinted solid-phase microextraction fiber and its application for the determination of triazines in complicated samples coupled with high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr. A**, **1147**, 1-9 (2007).
  127. XG Hu, JL Pan, YL Hu, GK Li. Preparation and evaluation of propranolol molecularly imprinted solid-phase microextraction fiber for trace analysis of  $\beta$ -blockers in urine and plasma samples. **J. Chromatogr. A**, **1216**, 190-197 (2009).
  128. XG Hu, GM Dai, JJ Huang, HJ Jin, Y Yu, Y Liang. Preparation and characterization of metolachlor molecularly imprinted polymer coating on stainless steel fibers for solid-phase microextraction. **Anal. Lett.**, **44**, 1358-1370 (2011).
  129. D Djozan, B Ebrahimi, M Mahkam, MA Farajzadeh. Evaluation of a new method for chemical coating of aluminum wire with molecularly imprinted polymer layer. Application for the fabrication of triazines selective solid-phase microextraction fiber. **Anal. Chim. Acta**, **674**, 40-48 (2010).
  130. C Carrillo-Carrión, S Cárdenas, BM Simonet, M Valcárcel. Quantum dots luminescence enhancement due to illumination with UV/Vis light. **Chem. Commun.**, 5214-5226 (2009).
  131. AH Lu, EL Salabas, F Schüth, Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application. **Angew. Chem. Int. Ed.**, **46**, 1222 – 1244 (2007).
  132. R Lucena, BM Simonet, S Cárdenas, M Valcárcel. Potential of nanoparticles in sample preparation. **J. Chromatogr. A**, **1218**, 620-637 (2011).
  133. B Nowack, TD Bucheli. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. **Environm. Pollut.**, **150**, 5-22 (2007).
  134. J Tian, J Xu, F Zhu, T Lu, C Su, G Ouyang. Application of nanomaterials in sample preparation. **J. Chromatogr. A**, **1300**, 2–16 (2013).
  135. R Lucena, BM Simonet, S Cárdenas, M Valcárcel. Potential of nanoparticles in sample preparation. **Chromatogr. A**, **1218**, 620–637 (2011).
  136. F Pena-Pereira, R Duarte, A Duarte. Immobilization strategies and analytical applications for metallic and metal-oxide nanomaterials on surfaces. **TraC Trends Anal. Chem.**, **40**, 90-105 (2012).
  137. A Ulman. An introduction to ultrathin organic films from Langmuir–Blodgett to self-assembly. Academic Press, Boston (1991).
  138. HY Wang, AD Campiglia. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in drinking water samples by solid-phase nanoextraction and high-performance liquid chromatography. **Anal. Chem.**, **80**, 8202-8209 (2008).
  139. HY Wang, AD Campiglia. Direct determination of benzo[*a*]pyrene in water samples by a gold nano-

- particle-based solid phase extraction method and laser-excited time-resolved Shpol'skii spectrometry. **Talanta**, **83**, 233-240 (2010).
140. JJ Feng, M Sun, HM Liu, JB Li, X Liu, SX Jiang. Au nanoparticles as a novel coating for solid-phase microextraction. **J. Chromatogr. A**, **1217**, 8079-8086 (2010).
141. G Karimipour, M Ghaedi, R Sahraei, A Daneshfar, MN Biyareh. Modification of gold nanoparticle loaded on activated carbon with bis(4-methoxysalicylaldehyde)-1,2-phenylenediamine as new sorbent for enrichment of some metal ions. **Biol. Trace Elem. Res.**, **145**, 109-117 (2012).
142. JJ Feng, M Sun, JB Li, X Liu, SX Jiang. A novel silver-coated solid-phase microextraction metal fiber based on electroless plating technique. **Anal. Chim. Acta**, **701**, 174-180 (2011).
143. SY Vasileva, AY Olenin, GI Romanovskaya, YA Krutyakov, VI Pogonin, AS Korotkov, BK Zuev. Adsorption preconcentration of pyrene by silver nanoparticles and its determination in aqueous solutions. **J. Anal. Chem.**, **64**, 1214-1220 (2009).
144. M Khajeh, E Sanchooli. Silver nanoparticles as a new solid-phase adsorbent and its application to preconcentration and determination of lead from biological samples. **Biol. Trace Elem. Res.**, **143**, 1856-1864 (2011).
145. S Baytak, F Zereen, Z Arslan. Preconcentration of trace elements from water samples on a minicolumn of yeast (*Yamadazyma spartinae*) immobilized TiO<sub>2</sub> nanoparticles for determination by ICP-AES. **Talanta**, **84**, 319-323 (2011).
146. D Wang, QT Wang, ZM Zhang, GN Chen. ZnO nanorod array polydimethylsiloxane composite solid phase micro-extraction fiber coating: fabrication and extraction capability. **Analyst**, **137**, 476-480 (2012).
147. JJ Ji, HH Liu, JM Chen, JB Zeng, JL Huang, LH Gao, YR Wang, X Chen. ZnO nanorod coating for solid phase microextraction and its applications for the analysis of aldehydes in instant noodle samples. **J. Chromatogr. A**, **1246**, 22-27 (2012).
148. WW Shen, HM Xiong, Y Xu, SJ Cai, HJ Lu, PY Yang. ZnO-poly(methyl methacrylate) nanobeads for enriching and desalting low-abundant proteins followed by directly MALDI-TOF-MS analysis. **Anal. Chem.**, **80**, 6758-6763 (2008).
149. K Ghanemi, Y Nikpour, O Omidvar, A Maryamabadi. Sulfur-nanoparticle-based method for separation and preconcentration of some heavy metals in marine samples prior to flame atomic absorption spectrometry determination. **Talanta**, **85**, 763-769 (2011).
150. A Afkhami, M Saber-Tehrani, H Bagheri, T Madrakian. Flame atomic absorption spectrometric determination of trace amounts of Pb(II) and Cr(III) in biological, food and environmental samples after preconcentration by modified nano-alumina. **Microchim. Acta**, **172**, 125-136 (2011).
151. H Bagheri, A Afkhami, M Saber-Tehrani, H Khoshshafar. Preparation and characterization of magnetic nanocomposite of Schiff base/silica/magnetite as a preconcentration phase for the trace determination of heavy metal ions in water, food and biological samples using atomic absorption spectrometry. **Talanta**, **97**, 87-95. (2012).
152. L Bai, B Mei, QZ Guo, ZG Shi, YQ Feng. Magnetic solid-phase extraction of hydrophobic analytes in environmental samples by a surface hydrophilic carbon-ferromagnetic nanocomposite. **J. Chromatogr. A**, **1217**, 7331-7336 (2010).
153. AH Lu, EL. Salabas, F Schüth. Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application. **Angew. Chem. Int. Ed.**, **46**, 1222-1244 (2007).
154. TS Lum, YK Tsoi, KS Yin-Leung. Current developments in clinical sample preconcentration prior to elemental analysis by atomic spectrometry: a comprehensive literature review. **J. Anal. At. Spectrom.**, **29**, 234-241 (2014).
155. AP Alivisatos. Semiconductor clusters, nanocrystals, and quantum dots. **Science**, **271**, 933-937 (1996).

- 
156. H Weller. Colloidal semiconductor Q-particles: Chemistry in the transition region between solid state and molecules. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.**, **32**, 41-53 (1993).
  157. CB Murray, DJ Norris, MG Bawendi. Synthesis and characterization of nearly monodisperse CdE (E = S, Se, Te) semiconductor nanocrystallites. **J. Am. Chem. Soc.**, **115**, 8706–8715 (1993).
  158. C Frigerio, DSM Ribeiro, SS Rodrigues, VLRG Abreu, JAC Barbosa, JAV Prior, KL Marques, JLM Santos. Application of quantum dots as analytical tools in automated chemical analysis: A review. **Anal. Chim. Acta**, **735**, 9–22 (2012).
  159. H Kuang, Y Zhao, W Ma, LG Xu, LB Wang, CL Xu. Recent developments in analytical applications of quantum dots. **TraC Trends Anal. Chem.**, **30**, 1620–1636 (2011).
  160. WR Algar, AJ Tavares, UJ Krull. Beyond labels: A review of the application of quantum dots as integrated components of assays, bioprobes, and biosensors utilizing optical transduction. **Anal. Chim. Acta**, **673**, 1–25 (2008).
  161. BO Dabbousi, J Rodriguez-Viejo, FV Mikulec, JR Heine, H Mattoussi, R Ober, KF Jensen, MG Bawendi. (CdSe)ZnS core-shell quantum dots: Synthesis and characterization of a size series of highly luminescent nanocrystallites. **J. Phys. Chem. B**, **101**, 9463-9475 (1997).