



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTUDIOS DE LAS PROPIEDADES ELECTRÓNICAS
DE CIPROFLOXACINO COMO QUIMIOSENSOR Y SU
DEGRADACIÓN FOTO-CATALÍTICA POR MEDIO DE
TiO₂ DOPADO CON METAL DE TRANSICIÓN.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERA QUÍMICA**

P R E S E N T A

YESSENIA SCARLETTE GARCÍA GUTIÉRREZ





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: DR. PLINIO JESUS SOSA FERNANDEZ
VOCAL: M. EN C. LUCIA CORNEJO BARRERA
SECRETARIO: DR. PANDIYAN THANGARASU
1er. SUPLENTE: DRA. HILDA ELIZABETH CALDERON VILLAGOMEZ
2Do. SUPLENTE: M. EN I. SERGIO ADRIÁN GARCÍA GONZÁLEZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 114 DEL EDIFICIO F, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM, CIUDAD UNIVERSITARIA, COYOACÁN, Cd. MX.

ASESOR DEL TEMA:

DR. PANDIYAN THANGARASU

SUPERVISOR TÉCNICO:

DR. CARLOS ALBERTO HUERTA AGUILAR

SUSTENTANTE:

YESSENIA SCARLETTE GARCÍA GUTIÉRREZ



*A la **Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA)** (**Proyectos IN217813 e IN209616**) por la beca brindada para realizar estudios foto-catalíticos para la degradación de contaminantes. Esta beca fue un gran aliciente para llegar a mi meta en tiempo y forma.*



Capítulo	Tema	Página
	LISTA DE ABREVIATURAS	IV
	RESUMEN	V
	ABSTRACT	VI
1.	INTRODUCCIÓN	2
2.	ANTECEDENTES	6
2.1.	Problemas de contaminación del agua	6
2.2.	Contaminantes inorgánicos	7
2.2.1.	Metales pesados (Cu ²⁺ y Al ³⁺)	7
2.3.	Contaminantes orgánicos	10
2.3.1.	Antibiótico ciprofloxacino	12
2.4.	Parte 1: Reutilización de ciprofloxacino como quimiosensor	14
2.5.	Parte 2: Degradación de ciprofloxacino por NPs de TiO ₂ y TiO ₂ -Ag	18
3.	JUSTIFICACIÓN	23
4.	OBJETIVOS E HIPÓTESIS	25
4.1.	Objetivos	25
4.1.1.	Objetivo general	25
4.1.2.	Objetivos particulares	25
4.2.	Hipótesis	25
5.	METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	27
5.1.	Materiales y equipos	27
5.2.	Mediciones físicas	27
5.3.	Propiedades físico-químicas de ciprofloxacino	29
5.3.1.	Ciprofloxacino como sensor químico	30
5.4.	Foto-degradación de ciprofloxacino mediante NPs de TiO ₂ o TiO ₂ -Ag bajo luz visible y UV	34
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
6.1.	Ciprofloxacino como quimiosensor	38



Capítulo	Tema	Página
6.2.	Sistema de puerta lógica	47
6.3.	Reconocimiento de Al ³⁺ y Cu ²⁺ en muestras biológicas	51
6.4.	Ciprofloxacino y su oxidación foto-catalítica	56
6.4.1.	Caracterización de NPs	56
6.4.2.	Degradación de ciprofloxacino por TiO ₂ o TiO ₂ -Ag mediante luz UV o visible.	61
6.4.3.	Análisis de productos de degradación de ciprofloxacino por HPLC de la oxidación de ciprofloxacino	70
6.4.4.	Mecanismo de degradación de ciprofloxacino	72
7.	CONCLUSIONES	76
	REFERENCIAS	77



LISTA DE ABREVIATURAS

ARBD:	Enfermedad ósea relacionada con aluminio.	PET:	Transferencia de electrones fotoinducida.
Cipro:	Ciprofloxacino.	POA:	Procesos de oxidación avanzada.
DD:	Dosis diarias.	ppm:	Partes por millón.
DLS:	Dispersión dinámica de luz.	SC0:	Levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> cultivada sin ciprofloxacino añadido al agar.
DRX:	Difracción de rayos X.	SCC:	Levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> cultivada con ciprofloxacino añadido al agar.
eV:	Electrón volts.	TBT:	Terbutóxido de titanio.
EDS:	Espectroscopía de energía dispersiva.	TEM:	Microscopía de transmisión electrónica.
FRET:	Transferencia de energía de resonancia de Förster.	u. a.:	Unidades arbitrarias.
HOMO:	Orbital molecular ocupado de mayor energía.	UV:	Ultravioleta.
HPLC:	Cromatografía líquida de alto rendimiento.	UV-Vis:	Ultravioleta-visible.
LUMO:	Orbital molecular no ocupado de menor energía.	λ:	Longitud de onda.
mM:	Milimolar.		
NPs:	Nanopartículas.		
OMS:	Organización Mundial de la Salud.		



RESUMEN

La detección de iones metálicos es importante para la investigación en medicina, células vivas y muestras ambientales. En este trabajo, el antibiótico ciprofloxacino (Cipro) se utilizó como un quimiosensor para la detección simultánea de Al^{3+} y Cu^{2+} por puertas lógicas asistidas por fluorescencia. Se probó la interferencia de iones metálicos coexistentes comunes como Cd^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Sr^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Fe^{3+} , K^+ , Al^{3+} , Sm^{3+} , Ag^+ , Na^+ , Ba^{2+} , Bi^{3+} , Cr^{3+} , Zn^{2+} y Mn^{2+} , y se encontró que no existe interferencia con la detección de Al^{3+} y Cu^{2+} . Curiosamente, la intensidad de fluorescencia se extingue para Cu^{2+} y aumenta para Al^{3+} con la concentración creciente en presencia de Cipro, mostrando que actúa como un quimiosensor que desactiva y activa la fluorescencia, respectivamente; sin embargo, con una adición secuencial de Cu^{2+} a Cipro, seguido por Al^{3+} , la intensidad de fluorescencia aumenta en gran medida, convirtiéndose en el modo de fluorescencia activada. Otras combinaciones de iones metálicos adicionadas a Cipro no cambian el comportamiento de la fluorescencia. Es importante destacar que la detección de Al^{3+} y Cu^{2+} en muestras reales como células vivas muestran que Cipro actúa eficientemente como sonda fluorescente para el ion Al^{3+} en sistemas vivos, especialmente en *Saccharomyces cerevisiae*; esto es confirmado por microscopía confocal de barrido láser.

Se prepararon nanopartículas (NPs) de TiO_2 y se doparon con NPs de Ag, las cuales se caracterizaron por DRX, TEM, EDS, DLS y espectro UV-Visible. La oxidación fotocatalítica de Cipro mediante las NPs anteriores se estudió bajo luz visible así como radiación UV. La oxidación del sustrato fue monitoreada por medio de fluorescencia. Curiosamente, a pHs altos, la intensidad de fluorescencia aumenta cuando el Cipro se expone bajo UV o luz visible en presencia de $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ y TiO_2 y este aumento de intensidad sigue una cinética de primer orden en el sustrato, para lo cual se propone un posible mecanismo. El efecto del pH también se analizó en la oxidación, mostrando que a valores de pH bajos, el sustrato no se sometió a variaciones significativas de fluorescencia.



ABSTRACT

Detection of metal ions is important for research in medicine, living cells and environmental samples. In this work, the antibiotic ciprofloxacin (Cipro) is used as a chemo-sensor for the simultaneous detection of Al^{3+} and Cu^{2+} by fluorescent assisted logic gates. The interference of common coexisting metal ions such as Cd^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Sr^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Fe^{3+} , K^+ , Al^{3+} , Sm^{3+} , Ag^+ , Na^+ , Ba^{2+} , Bi^{3+} , Cr^{3+} , Zn^{2+} and Mn^{2+} was tested, and no interference with the detection of Al^{3+} and Cu^{2+} was found. Interestingly, the fluorescence intensity quenches for Cu^{2+} and enhances for Al^{3+} with the increasing concentration in the presence of Cipro, showing that it acts as fluorescence-OFF and – ON, respectively; however, with a sequential addition of Cu^{2+} to Cipro, followed by Al^{3+} , the fluorescence intensity greatly increases, becoming the fluorescence-ON mode. Other combinations of metal ions addition to Cipro do not change the fluorescence behavior. Importantly, the detection of Al^{3+} and Cu^{2+} in the real samples like living cells shows that Cipro efficiently performs as fluorescent probe for Al^{3+} ion in living systems, especially in *Sacharomyces cerevisiae*; this is confirmed by confocal laser scanning microscopy.

TiO_2 NPs were prepared, and doped with Ag NPs to yield TiO_2 -Ag NPs, and they were characterized by XRD, TEM, EDS, DLS and UV-Visible spectra. The photo-catalytic oxidation of ciprofloxacin by the above NPs were analyzed under both visible and UV light. The oxidation of substrate was monitored by fluorescence technique. Interestingly, at high pHs, the intensity of fluorescence was increased when ciprofloxacin was exposed under UV or visible lights in the presence of TiO_2 -Ag and the intensity increase follows first order kinetics in the substrate, for which a possible mechanism is proposed. The effect of pH was also analyzed in the oxidation, showing that at low pHs, the substrate does not underwent much changes in the fluorescence.



CAPÍTULO 1



1. INTRODUCCIÓN

La contaminación del agua es uno de los problemas graves desde el punto de vista ambiental y necesita una atención considerable debido a la necesidad de agua limpia [1]. La presencia de compuestos farmacéuticos no biodegradables en aguas superficiales [2], agua potable [1, 3, 4], afluentes de aguas residuales [5], residuos hospitalarios [6] y efluentes de plantas de tratamiento de agua [2, 7-9] causa graves problemas ambientales [1]. Los antibióticos representan un arsenal de agentes químicos para combatir las infecciones bacterianas; sin embargo, una liberación de estos fármacos generados por las industrias farmacéuticas en los sistemas acuáticos causa problemas ambientales; por ejemplo, la captación celular de antibióticos aumentará inevitablemente el riesgo de muerte microbiana, alteración ecológica, amplificación de genes de resistencia a antibióticos e incluso la creación de "superbacterias" [10-12]. Estudios previos indican que el consumo de quinolonas de segunda generación es en promedio tres veces mayor que el de la primera y la tercera generación de quinolonas [13]. De las quinolonas de segunda generación, el Cipro representó el 73% del consumo total, con 0.39 hasta 1.8 dosis diarias (DD) por cada 1000 habitantes [14]. Esta quinolona se utiliza ampliamente en aguas como las aguas residuales (28,000 a 31,000 µg/L); hospitales (cantidades mayores a 10.0 µg/L), agua municipal (0.255 a 0.568 µg/L) y tierras agrícolas (0.020 a 0.100 µg/L, en China central) [14-17].

Así mismo, los nuevos sensores altamente selectivos para la detección de varios iones metálicos o aniones a través del cambio de modos (activado y desactivado) en luminiscencia [18-23] pueden aplicarse en las especies biológicas y ambientales [24-27]. Dado que la espectrofluorimetría tiene alta sensibilidad, selectividad, rapidez y un fácil procedimiento operacional [28-30] en comparación con otros métodos como espectroscopia de absorción atómica, colorimetría, espectrofotometría y voltametría, puede emplearse eficientemente para detectar iones metálicos, aniones o moléculas orgánicas mediante la medición de cambios en la señal de fluorescencia. La presencia



del ion aluminio en el agua es tóxica para las especies biológicas, en particular, generando la enfermedad de Alzheimer y las enfermedades de Parkinson y la esclerosis lateral amiotrófica [31-35]. Sin embargo, la presencia de aluminio en el agua es inevitable ya que se emplea generalmente para el tratamiento de aguas residuales mediante co-precipitación. Del mismo modo, el cobre es un elemento traza esencial e indispensable que se encuentra en la fisiología humana, y se requiere a concentraciones bajas para el proceso biológico en las plantas y animales, incluyendo en el cuerpo humano; pero en cantidad excesiva, podría causar estrés oxidativo y los trastornos asociados con enfermedades neuro-degenerativas como Menkes, de Wilson, enfermedad de Parkinson, Alzheimer y enfermedades priónicas; también podría causar daño renal y hepático. En el presente estudio, el antibiótico ciprofloxacino se utiliza como quimiosensor para la detección de iones Al^{3+} y Cu^{2+} en agua, y como aplicación adicional, la concentración de Cipro también puede determinarse mediante la técnica de fluorescencia añadiendo Al^{3+} o Cu^{2+} .

La descarga de los productos farmacéuticos en el medio ambiente de las plantas de tratamiento de aguas residuales sugiere muchos procesos de tratamiento convencionales que a menudo no son eficaces en la reducción de sus niveles en la corriente de aguas residuales [36]. Una serie de estudios sobre la eliminación de los productos farmacéuticos desde el medio ambiente acuático se ha llevado a cabo recientemente, en particular la degradación de ciprofloxacino en agua mediante procesos de oxidación avanzada (POA) [37-39]. Entre estos métodos, la oxidación fotocatalítica de contaminantes orgánicos utilizando TiO_2 se ha estudiado ampliamente ya que proporciona alta estabilidad química, no es tóxico, es reutilizable y está fácilmente disponible [40, 41]; sin embargo, existe una baja actividad catalítica bajo irradiación de luz visible (λ mayor a 400 nm) debido a que el TiO_2 tiene una gran separación de bandas (3.2 eV para anatasa [36, 42, 43] y 3.0 eV para rutilo [44, 45]), además de la rápida recombinación de pares electrón-hueco foto-generados [40] y la baja relación de superficie-volumen causa baja eficiencia. Por lo tanto, los procesos fotocatalíticos de TiO_2 anatasa bajo luz visible ($\lambda > 400$ nm) es la técnica preferida [46] mediante la ampliación de su respuesta óptica en la región visible a través de dopaje o depósito de



NPs metálicas o no metálicas [47-49]; ya que pueden extender de manera efectiva su foto-actividad hacia la región visible debido a la separación eficaz de las cargas y reducir la brecha de bandas del TiO_2 . Por otra parte, este proceso también puede disminuir la rapidez de recombinación par electrón-hueco, lo que facilita la formación de radicales libres [50, 51].



CAPÍTULO 2



2. ANTECEDENTES

2.1. Problemas de contaminación del agua

El océano contiene el 97% del agua de la tierra; el 3% restante es agua dulce que es sobre todo inaccesible. Del 3% de agua no encontrada en el océano, aproximadamente el 69% está congelada en glaciares y en capas de hielo. Sólo alrededor del 1% del agua dulce en la Tierra está disponible para sostener y apoyar la vida en nuestro planeta. Con la población mundial que se espera que aumente de 7 mil millones en 2014 a 9 mil millones en 2050 y el crecimiento industrial continuo en todo el mundo, la naturaleza esencial del agua la ha convertido en un recurso natural estratégico a nivel mundial por su impacto en el ambiente, la sociedad, la salud, los alimentos, la energía y la economía; ya que su falta de saneamiento y mal abastecimiento afecta la seguridad de los niños y los pobres. Debido a la multiplicidad de factores que plantean serios desafíos al suministro de agua dulce, como el cambio climático, el agotamiento de las aguas subterráneas y la contaminación de las fuentes de agua, el problema de la escasez de agua se ha convertido en un motivo de grave preocupación [52, 53].

Desafortunadamente, las descargas de residuos industriales y domésticos (directa o indirectamente, a través de fugas en los sistemas de alcantarillado) en las fuentes de agua causan una contaminación excesiva de las aguas superficiales y subterráneas. En consecuencia, se pierde la calidad del agua y el valor del riego, por lo que se ha vuelto motivo de preocupación importante por los efectos de estos contaminantes sobre la salud humana y el medio ambiente, dependiendo de la concentración, duración y trayectoria de exposición. Algunos micronutrientes esenciales, tales como los oligoelementos presentes generalmente en concentraciones más bajas, pueden llegar a ser tóxicos en concentraciones más altas [53-55].

De acuerdo a la Fig. 2.1, entre los contaminantes, podemos mencionar dos clases: los inorgánicos y los orgánicos.

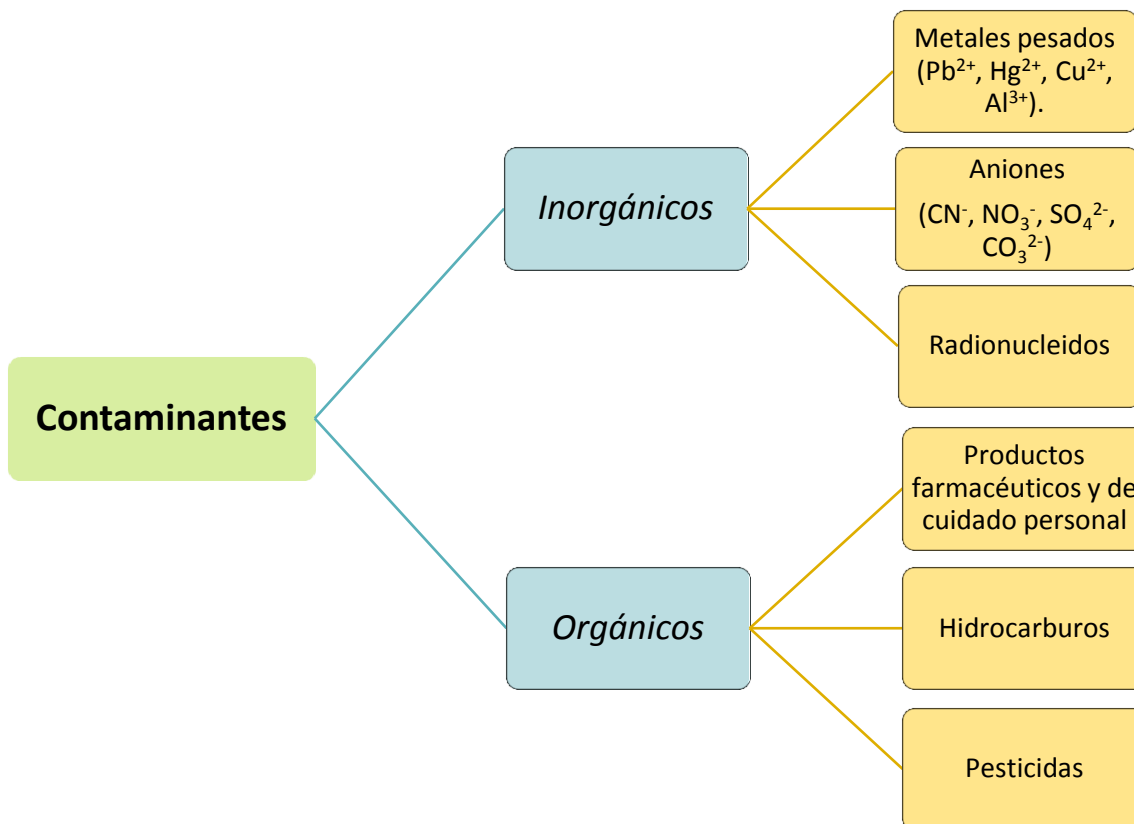


Fig. 2.1: Clasificación de contaminantes.

2.2. Contaminantes inorgánicos

Entre los contaminantes inorgánicos destacan los metales pesados tóxicos como el plomo, el cadmio, el cobre y el aluminio, los aniones y los radionucleidos.

2.2.1. Metales pesados (Cu²⁺ y Al³⁺)

Los metales pesados son contaminantes tóxicos que existen ampliamente en las aguas residuales y su presencia es motivo de preocupación para las industrias y organizaciones medioambientales de todo el mundo. La mayoría de estos contaminantes son severamente tóxicos y peligrosos para la salud humana, dependiendo especialmente de sus formas químicas más que de su contenido elemental total, por lo que los estudios de especiación cobran cada vez más



importancia. Por lo tanto, la separación de las diferentes especies de elementos y la determinación de trazas de metales pesados es a menudo una tarea importante para los químicos analíticos, ya que es esencial para la identificación y el monitoreo de sustancias tóxicas en muestras ambientales [54, 56].

Para la determinación de metales pesados se han aplicado diversas técnicas instrumentales, entre las que se incluyen la espectrometría de absorción atómica electrotermica, la espectrometría de emisión óptica de plasma acoplada inductivamente, la espectrometría de absorción atómica de llama, la espectrometría de masa por plasma inductivamente acoplado, la espectrometría DRX de reflexión total y la espectrofluorimetría. Dado que los niveles de concentración de metales pesados en muestras ambientales son bastante bajos y la complejidad de las matrices es un problema principal, a menudo se requieren técnicas de preconcentración. Para la extracción y pre-concentración de metales pesados en matrices naturales se han desarrollado diferentes procedimientos como la extracción líquido-líquido, el intercambio iónico y la extracción en fase sólida [56].

- **Cu²⁺:**

El cobre, como el tercer oligoelemento más abundante tras el hierro y el zinc en sistemas biológicos y ecológicos, juega un papel importante en una variedad de procesos fisiológicos fundamentales, incluyendo la formación ósea, el desarrollo del tejido conectivo, la respiración celular, la regulación de la hemoglobina sanguínea, la prevención de la anemia y las reacciones de transferencia de electrones que implican la oxidación de diversos sustratos orgánicos. Al mismo tiempo, la alta concentración de cobre es tóxica y daña gravemente al medio ambiente (principalmente por el uso generalizado en la industria y la agricultura). El contenido de cobre total del cuerpo humano adulto contiene típicamente aproximadamente de 70 a 80 mg de cobre en circunstancias normales. Sin embargo, los iones de cobre en los niveles anormales son nocivos y pueden causar estrés oxidativo e inducir enfermedades neurodegenerativas graves como el Alzheimer, el Parkinson, Menkes, Wilson y priones en humanos.



Además, la acumulación de Cu^{2+} en el hígado y los riñones pueden causar problemas gastrointestinales, hipoglucemia, dislexia y daño hepático infantil. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció el límite de seguridad del cobre en el agua potable a 2 ppm (31.5 mM). Por lo tanto, es esencial un método fiable para determinar la cantidad de Cu^{2+} en muestras biológicas y ambientales [57-60].

- **Al^{3+} :**

El aluminio, el metal más abundante y el tercer elemento más prevalente en la biosfera, está ampliamente disperso y aplicado en el mundo moderno: en el cuerpo de agua natural, los aditivos de alimentos, las medicinas, materiales de envasado y utensilios de cocina, en la industria papelera, textil y cosmética, y en ciertos tipos de aleaciones ligeras. Además, algunas sales de aluminio, se utilizan en antitranspirantes y como coagulantes en plantas de tratamiento de aguas residuales. Por otra parte, el tamaño y la carga de Al^{3+} lo convierten en un inhibidor competitivo de varios elementos esenciales de propiedades similares como Mg^{2+} , Ca^{2+} y Fe^{3+} . La acumulación de una cantidad excesiva de metal puede conducir a diversos problemas fisiológicos y bioquímicos, tales como la enfermedad ósea relacionada con aluminio (ARBD), la anemia hipocrómica microcítica, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, demencia y osteomalacia, y posiblemente también cáncer de pulmón y vejiga. Según un informe de la OMS, la ingesta humana diaria promedio de aluminio es de aproximadamente de 3 a 10 mg y la ingesta de aluminio semanal tolerable en el cuerpo humano se estima en 7 mg/kg de peso corporal. Sin embargo, debido a la mala capacidad de coordinación de Al^{3+} en comparación con los metales de transición, una fuerte tendencia a la hidratación y la falta de propiedades espectroscópicas, la detección de Al^{3+} siempre ha sido problemática; por lo que se pone en peligro el medio ambiente y la salud humana [61-63].

Si bien, el cobre y el aluminio, así como otros metales pesados, son importantes para los seres vivos y el medio ambiente, el uso excesivo por las industrias y el mal manejo de residuos han generado una fuerte necesidad de controlar los niveles de estos



metales en los cuerpos de agua. Por lo tanto, la detección simultánea de iones Al^{3+} y Cu^{2+} y su estudio en muestras reales son importantes.

2.3. Contaminantes orgánicos

Entre los principales contaminantes orgánicos, los cuales poseen por lo menos un anillo aromático en su estructura, se encuentran los fenoles, hidrocarburos, pesticidas, productos farmacéuticos y de cuidado personal, aditivos, etc.

Actualmente, debido a su notable utilización y efectos biológicos y ecotoxicológicos peligrosos, los productos de cuidado personal y los productos farmacéuticos pueden considerarse como uno de los principales grupos de contaminantes del agua. Aunque las concentraciones de productos farmacéuticos en las aguas superficiales son normalmente bastante bajas (es decir, menos de 1 g/L), el uso generalizado y rápido de los productos farmacéuticos tanto en la sanidad veterinaria como en la humana es especialmente preocupante debido principalmente al uso elevado de (1) esteroides para la promoción del crecimiento y (2) antibióticos humanos y para profilaxis en el ganado destinado a la producción de alimentos. Se sabe que los productos farmacéuticos y sus metabolitos entran en las plantas de tratamiento de aguas residuales; sin embargo, debe tenerse en cuenta que algunos de ellos no pueden ser completamente eliminados o transformados durante los métodos convencionales de tratamiento de aguas residuales. Las aguas residuales de las industrias, los hospitales y los efluentes de los locales domésticos se arrojan directamente a las aguas superficiales y subterráneas sin ningún tratamiento previo de descontaminación. Esto puede resultar en contaminación y efectos perturbadores. La mayoría de estos productos farmacéuticos, debido a su alta resistencia a los métodos convencionales de tratamiento de aguas residuales, son persistentes en ciclos de agua y por lo tanto, se hacen omnipresentes en el medio ambiente. Sin embargo, actualmente no existen regulaciones para niveles aceptables de productos farmacéuticos en aguas residuales hospitalarias o municipales. Por lo tanto, el efecto de estos productos farmacéuticos y sus metabolitos en el medio



ambiente, su genotoxicidad y toxicidad aguda han sido objeto de serias investigaciones científicas [64, 65].

En la Fig. 2.2, y como se ha mencionado anteriormente, se destaca la importancia de realizar aportaciones a la investigación sobre contaminantes orgánicos. Esta tesis se centra en plantear y analizar dos estrategias diferentes para disminuir la concentración de un contaminante orgánico (antibiótico ciprofloxacino) en las aguas residuales.

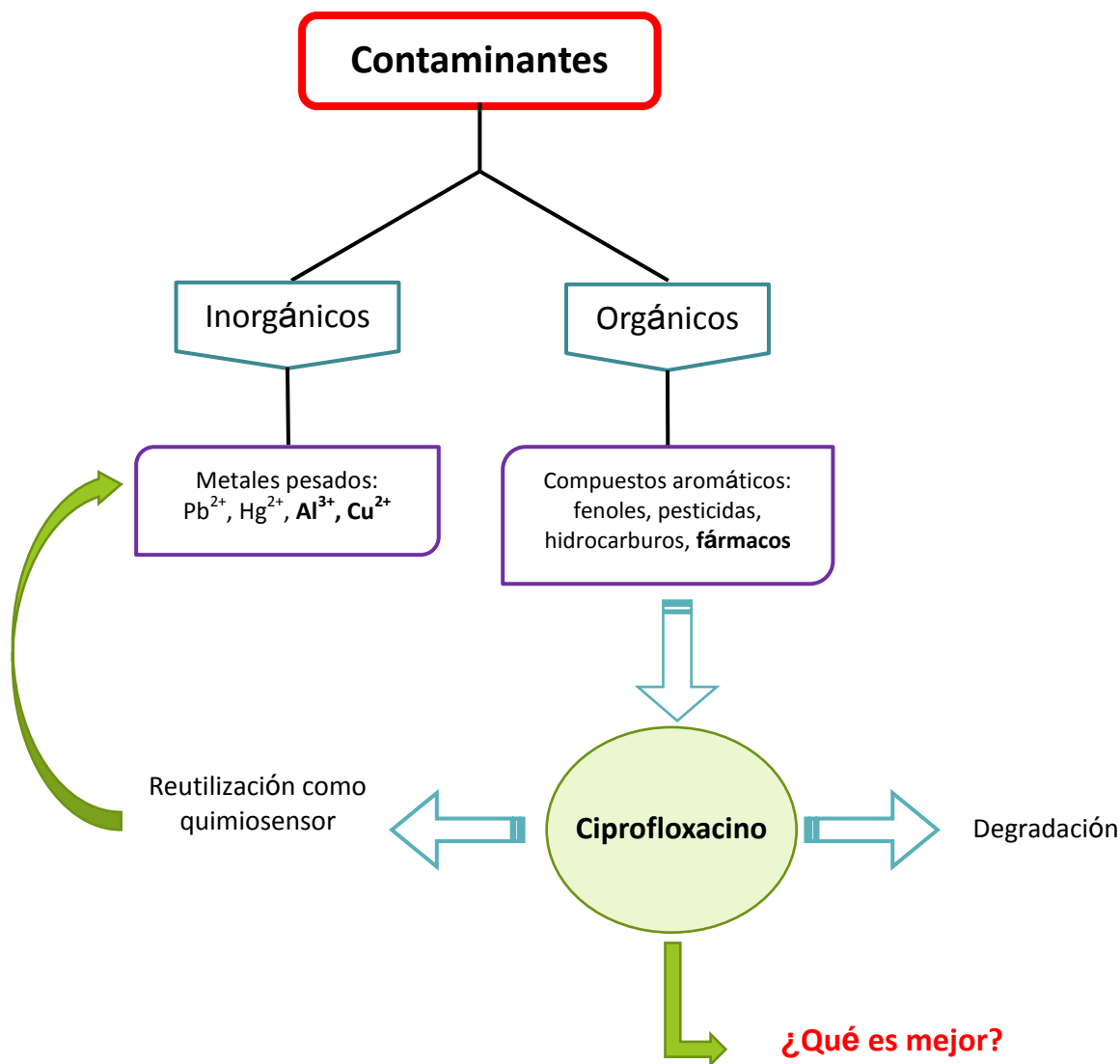


Fig. 2.2: Esquema general de la problemática alrededor del antibiótico ciprofloxacino y dos posibles estrategias para combatirla.



2.3.1. Antibiótico ciprofloxacino

Los antibióticos son una de las clases farmacéuticas más frecuentemente observadas en efluentes de aguas residuales debido a su ubicuidad de uso tanto en salud animal como humana. Sin embargo, sólo una pequeña proporción de los antibióticos suministrados son metabolizados o absorbidos por el animal o el ser humano, y la mayor parte de la dosis de antibióticos se libera en las excretas, entrando en el suelo y el agua. Muchos estudios ambientales se han centrado en la presencia de los mismos antibióticos comerciales en las aguas residuales y las aguas superficiales. Por lo tanto, hay una creciente preocupación acerca de los riesgos potenciales de los residuos de antibióticos para el medio ambiente terrestre, ya que pueden estimular el desarrollo de genes de resistencia a los antibióticos o bacterias resistentes a los antibióticos. Las bacterias expuestas a los residuos antimicrobianos presentes en las matrices ambientales pueden sufrir alteraciones en sus genes, dando como resultado microorganismos que son resistentes al compuesto. Se deben usar fármacos más potentes en el tratamiento de enfermedades debido a bacterias resistentes a fármacos. Por lo tanto, es muy importante utilizar tecnologías de tratamiento que sean capaces de eliminar la actividad antimicrobiana residual de estos compuestos. [66, 67].

Las fluoroquinolonas (una estructura de anillo de quinolona sustituida por flúor), representan una de las clases más importantes de antibióticos basadas en sus ventas mundiales anuales y versatilidad terapéutica. Se trata de antibióticos producidos sintéticamente, activos contra un amplio espectro de bacterias patógenas gram-negativas y gram-positivas. En consecuencia, se utilizan como antibióticos de primera elección para las enfermedades infecciosas bacterianas generales como infecciones gastrointestinales, urinarias, respiratorias, oculares y de la piel, y sus eficacias son muy apreciadas. Sin embargo, el uso no controlado de quinolonas representa un riesgo potencial para la salud humana, ya que tal uso conduce a la aparición de residuos en los alimentos humanos, ya que del 20 al 80% de las fluoroquinolonas que se ingieren se excretan en una forma farmacológicamente activa, lo que lleva al desarrollo de resistencia bacteriana y alergias [66, 68].



El ácido 1-ciclopropil-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxo-7-(piperazinil)-quinolona-3-carboxílico (ciprofloxacino), pertenece a la segunda generación de quinolonas con un átomo de flúor en la posición 6 (fluoroquinolonas) (Fig. 2.3). Es un producto de degradación primaria de la enrofloxacina, que se utiliza en todo el mundo en aplicaciones acuícolas y agrícolas. Trabaja inhibiendo tanto la subunidad A de ADN girasa bacteriana (topoisomerasa II) como una enzima esencial que mantiene los giros súper helicoidales en el ADN bacteriano, lo que afecta el crecimiento y la reproducción de las bacterias. El ciprofloxacino se transporta fácilmente al medio ambiente mediante la descarga de aguas residuales y la escorrentía directa. La investigación sobre la biodegradabilidad del ciprofloxacino demostró que no es "fácilmente biodegradable" en el agua. El estudio del comportamiento de las fluoroquinolonas durante el tratamiento mecánico, químico y activo de los lodos de las aguas residuales y la digestión de los lodos demostró que más del 70% de la cantidad total de ciprofloxacino y norfloxacino pasa a través de la planta de tratamiento de aguas residuales tal como lodo digerido cuando se adsorben a los lodos durante este tratamiento. De hecho, el ciprofloxacino en el agua se transfiere principalmente de una fase a otra, pero no se degrada realmente después del tratamiento por las plantas tradicionales de tratamiento de aguas residuales, que pueden causar la contaminación secundaria del medio ambiente [68-70].

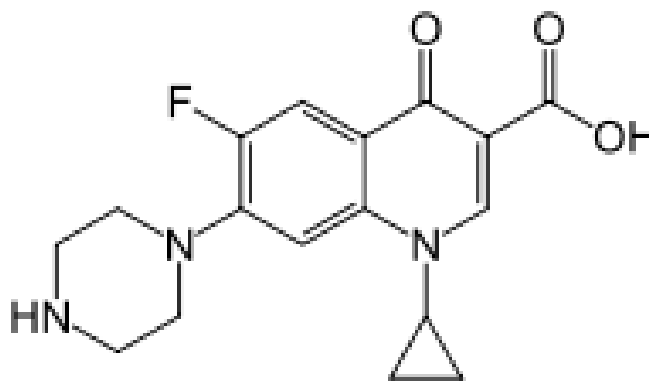


Fig. 2.3: Estructura química del ciprofloxacino.

El monitoreo de bajas cantidades de estos compuestos de diferentes matrices ambientales es esencial para la protección de la salud humana y el control ambiental.



Se ha publicado un gran número de métodos para la determinación de fluoroquinolonas en aguas ambientales, incluyendo especialmente la cromatografía líquida con detección de fluorescencia (LC-FD) o masa (LC-MS). Pero también es muy importante utilizar tecnologías de tratamiento que sean capaces de eliminar la actividad antimicrobiana residual de estos compuestos. Sin embargo también hay estudios que prueban que la exposición a la luz solar debilitará la persistencia de fluoroquinolonas en la zona [71, 72].

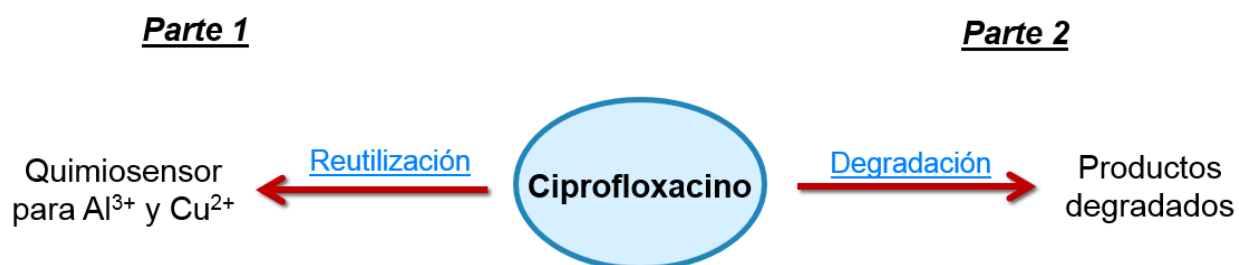


Fig. 2.4: Propuestas de acción frente a la presencia de ciprofloxacino en aguas residuales.

De acuerdo al esquema anterior (Fig. 2.4), para remover o contribuir en la disminución de la concentración de ciprofloxacino (contaminante orgánico emergente) en los cuerpos de agua, el presente trabajo se dividirá en dos partes. La Parte 1 trata de la reutilización de ciprofloxacino como quimiosensor para la detección simultánea de los iones metálicos Cu^{2+} y Al^{3+} (contaminantes inorgánicos) en medio acuoso; mientras que en la Parte 2 se presenta, como una segunda alternativa, la degradación foto-catalítica de ciprofloxacino mediante NPs de TiO_2 y $\text{TiO}_2\text{-Ag}$.

2.4. Parte 1: Reutilización de ciprofloxacino como quimiosensor.

La espectro-fluorimetría tiene alta sensibilidad, selectividad, rapidez y un fácil procedimiento operacional [28-30] en comparación con otros métodos como espectroscopia de absorción atómica, colorimetría, espectrofotometría y voltametría, por lo que puede emplearse eficientemente para detectar iones metálicos, aniones o moléculas orgánicas mediante la medición de cambios en la señal de fluorescencia.



Así, la técnica de fluorescencia se utiliza con éxito para detectar numerosos iones metálicos en muestras biológicas [73-78] como sigue: Ca^{2+} [79], Mg^{2+} [80-82], Pb^{2+} [83-85], Cd^{2+} [86-88], Al^{3+} [89-92], Cr^{3+} [93, 94], Hg^{2+} [95-99], Fe^{3+} [100], Co^{2+} [101, 102], Ni^{2+} [103, 104], Zn^{2+} [105-111], Cu^{2+} [112-114], Ag^+ [115, 116], Mn^{2+} [117]; iones metálicos raros de la Tierra [118-121]. A parte de la detección de iones metálicos, esta técnica se ha aplicado en la detección de plaguicidas, dinamita, biomoléculas, gases tóxicos e incluso células cancerosas, debido a la sensibilidad ultra-alta con la que se realiza la detección, principalmente en condiciones ambientales, así como a la visualización en células vivas mediante microscopía confocal. Estos sensores basados en fluorescencia son sistemas emisores de luz que proporcionan amplificación o extinción de señal tras la unión o liberación de un analito bajo una variedad de condiciones. El diseño de un sensor fluorescente con una varianza de señal significativa es importante para detectar el analito en un rango de concentración más bajo [59, 63].

Los receptores cromogénicos, capaces de transformar la unión de especies iónicas en señales espectroscópicas, son especialmente atractivos debido a que el proceso de reconocimiento puede monitorear conveniente y fácilmente los iones objetivo en el rango visible con alta selectividad, simplicidad, bajo costo y seguimiento rápido de analitos en muestras biológicas, toxicológicas y ambientales. Estas sondas fluorescentes se explotan ampliamente en biología, biotecnología, reconocimiento molecular, diagnóstico clínico y analítico y ciencias de la vida. El diseño, la síntesis y la caracterización espectroscópica de nuevos quimiosensores fluorescentes son actualmente de interés y están atrayendo considerable atención en la química biomimética. [58, 60, 62].

Dado que el Cu^{2+} paramagnético es un notable apagador de fluorescencia, sólo unos cuantos quimiosensores fluorescentes radiométricos para Cu^{2+} están disponibles en la bibliografía. Ciertamente, algunos manuscritos muestran amplificaciones de fluorescencia con Cu^{2+} , pero Cu^{2+} también tiene interferencia con otros metales [58]. Actualmente varios investigadores han desarrollado quimio-sensores para la detección de iones de cobre de la siguiente manera: curcumina [57], derivado de p-dimetilaminobenzamida [122], cumarina o en forma de cumarina hidrazida [123-125],



derivados de 4-aminoantipirina [126], acetatos de 4-(1,4,5-trifenil-1H-imidazol-2-il)anilil [127], benzo-ditiofeno [128], polímeros con terperidina colgante [129], tiourea con polímero conjugado [130, 131], residuo de piperazinilo [132], derivado de rodamina B [133], colorantes de rodamina acoplados a dipicolilamina [134], derivado de rodamina multifuncional [135], quinaldina-indol [136], 3,5-diclorosalicilal-dehído-omicron-rodamina B hidrazona [137], pireno o naftalamida a base de semicarbazida [138, 139], compuestos a base de pireno[140], calix 4 areno ligado a benzotiazol [141], residuo de pirrol [142], base simple de Schiff [143], ferroceno-antraceno [144]. Un quimiosensor fluorescente del tipo “turn-on” para la detección de ión Cu^{2+} [145] y también algunos de los sensores anteriores se han aplicado en células vivas [57, 77, 122, 140, 146, 147].

Tabla 2.1: Quimiosensores reportados para la detección de Al^{3+} .

Compuestos orgánicos utilizados como quimiosensores para Al^{3+}	Medio Disolvente	Referencias
7-metoxicromona-3-carbaldehído-((2-tiobenzotiazolilo)acetil) hidrazona	Etanol	[30]
1-(2-piridilazo)-2-naftol	Metanol	[89]
N´-(4-dietilamino-2-hidroxibencilideno)-2-hidroxi-benzohidrazida	$\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$	[148]
1-(2-hidroxi-5-iminometilfenil)- naftaleno-2-ol	Agua/Metanol	[149]
3,5-bis((E)-(2-iminohidroxifenil)metil)-4-hidroxibenzoato	Metanol	[150]
8-formyl-7-hydroxyl-4-metilcumarina–(2´-metil quinolina -4- formil) hidrazona	Etanol	[151]
2-((E)-(2-((E)-2-hidroxibencilideno-amino)iminofenil)metil)fenol	Metanol	[152]
Derivados de 2-aldehído cloronicotínico-rodamina B funcionalizado	CH_3CN	[153]
N,N´-bis(2-hidroxi-1-naftaldehído)-1,2-fenilendiamina	DMF	[154]
4-(8-hidroxiquinolina-7-il)metilen-imino-1-fenil-2,3-dimetil-5-pyazole	Metanol/Agua	[155]



La detección de Al^{3+} en medio acuoso es importante aunque difícil en comparación con otros iones metálicos. Por lo tanto, una variedad de quimiosensores se ha divulgado recientemente para la detección de Al^{3+} . Los estudios de la Tabla 2.2 muestran que la mayoría de los quimiosensores son adecuados sólo en medio no acuoso (metanol, etanol, DMF o mezcla de disolventes) debido a su capacidad de coordinación deficiente y su fuerte tendencia de hidratación. Aunque estos sensores detectan eficientemente el ion Al^{3+} , su aplicación en muestras reales se limita en la literatura, sobre todo en bioimágenes de células vivas [63, 148, 156-158].

Las puertas lógicas moleculares [22, 159-165] definida como una reacción química como entrada y la respuesta de la fluorescencia como salida, se pueden utilizar para sensores bioquímicos/ópticos [166-170]. El estudio de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* tiene muchas ventajas en comparación con los clásicos estudios bacterianos; principalmente, porque las levaduras son células eucariotas cuya similitud con células animales y humanas es mayor, en comparación con las células procariontas, como las bacterias. Las pruebas de sensores químicos en las células bacterianas tienen como principal desventaja las fuertes diferencias en la membrana celular y, también, la falta de organelos en la mayoría de las células procariontas podría conducir a resultados falsos ya que los procesos involucrados en la difusión y el metabolismo de sustratos externos no son tan complejos como los que se encuentran en las células eucariotas [171].

Por lo tanto, un compuesto orgánico adecuado que detecte iones Al^{3+} y Cu^{2+} es un desafío, y por otra parte, la detección de estos metales mediante el uso de antibióticos es interesante, sin embargo no existe ningún reporte en la literatura de que el ciprofloxacino esté siendo utilizado como un quimiosensor para iones metálicos. La mayoría de los estudios se han centrado en que los antibióticos son un problema ambiental, como contaminantes del agua. No hay estudios donde los antibióticos se utilicen para detectar cationes, aniones o moléculas orgánicas tóxicas. La novedad del presente trabajo es que el antibiótico ciprofloxacino está siendo empleado para detectar los iones metálicos tales como Al^{3+} o Cu^{2+} .



2.5. Parte 2: Degradación de ciprofloxacino por NPs de TiO₂ y TiO₂-Ag

Para remover antibióticos de agua residual como ciprofloxacino existen varios métodos, tal como se muestran en la Tabla 2.3.

Tabla 2.3: Métodos de remoción de antibióticos en cuerpos de agua.

Método	Ventajas	Desventajas
Tratamiento Convencional (anaerobio y aerobio)	<ul style="list-style-type: none"> Económicamente factible y de fácil manejo. Puede aplicarse a grandes cantidades. No genera productos o intermediarios tóxicos. Produce CH₄ y CO₂. 	<ul style="list-style-type: none"> No es eficiente para contaminantes aromáticos. Los compuestos aromáticos son tóxicos para los microorganismos. Los antibióticos matan a las bacterias.
Tratamiento físico-químico (coagulación-precipitación)	<ul style="list-style-type: none"> Rápida precipitación Reacción química (coagulación). 	<ul style="list-style-type: none"> Productos precipitados (no tratados). Alto costo (reactivos químicos). Aplicado a cantidades menores.
Procesos de oxidación avanzada	<ul style="list-style-type: none"> Efectivo para producir alto potencial oxidante (OH[•]). Reutilizable. Catalizador adecuado para pruebas de efectividad bajo luz visible. No genera lodos tóxicos. 	<ul style="list-style-type: none"> Alta energía de brecha de bandas (requiere luz UV). Alta recombinación de par electrón-hueco. Baja separación de cargas.

Los procesos de oxidación avanzada son conocidos como métodos eficientes para eliminar contaminantes orgánicos no biodegradables de aguas subterráneas, superficiales y residuales. Su efectividad depende del radical OH[•] *in situ* generado que es capaz de oxidar moléculas orgánicas hasta su mineralización. Estos radicales pueden ser producidos por métodos químicos, fotoquímicos o electroquímicos. Existen varios estudios disponibles sobre la degradación de contaminantes orgánicos tales como pesticidas, colorantes, productos farmacéuticos, compuestos aromáticos,



nitrofenoles o surfactantes mediante la foto-oxidación Fenton. Algunos estudios han demostrado que es un método de tratamiento viable para degradar o eliminar el ciprofloxacino del agua y las aguas residuales [69].

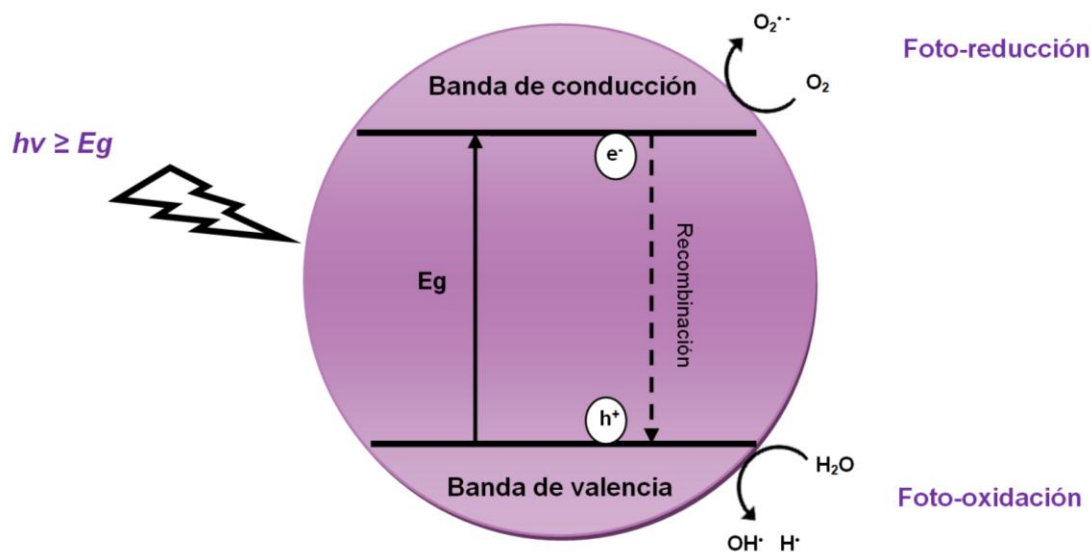


Fig. 2.5: Generación de par electrón-hueco en un semiconductor foto-catalítico.

Un sistema fotocatalítico basado en un semiconductor puede ser descrito por el modelo bandgap (brecha de banda), en el que la banda de valencia que es la banda ocupada más alta y la banda de conducción que es la banda vacía más baja, están separadas por una brecha de banda; una región de energías prohibidas en un cristal. Un electrón es excitado a la banda de conducción y deja un hueco (h^+) en la banda de valencia cuando la energía incidente es igual o mayor que la brecha de banda del semiconductor, como se muestra en la Fig. 2.5. El electrón foto-excitado se utiliza en una reacción de reducción con un aceptor de electrones; por ejemplo, la reducción de protones en hidrógeno, la generación de un radical $O_2^{\cdot-}$ o la reducción de CO_2 , pero sólo si el mínimo de la banda de conducción se encuentra en un potencial más negativo que el potencial electroquímico de la reacción deseada. En la banda de valencia del semiconductor, el hueco foto-generado también puede realizar una reacción oxidativa



con un donante de electrones con potencial de oxidación más negativo que la banda de valencia máxima [172].

Entre los procesos de oxidación avanzada disponibles, la fotocatalisis con dióxido de titanio (TiO_2), especialmente en su fase cristalina anatasa, como catalizador es capaz de lograr la oxidación completa de los contaminantes orgánicos mediante la generación de radicales hidroxilo cuando el catalizador está expuesto a la radiación ultravioleta. Es el fotocatalizador más utilizado debido a su bajo costo, su no toxicidad y su estabilidad. Debe señalarse que la adsorción de contaminantes por TiO_2 es la clave de este proceso de oxidación avanzada, ya que el compuesto necesita ser adsorbido sobre la superficie del catalizador para que tenga lugar la reacción de oxidación. La eficiencia de la adsorción del compuesto en el semiconductor varía. Esto depende del contaminante, la concentración del adsorbente, el pH y la complejidad de la matriz. Por otra parte, TiO_2 tiene dos inconvenientes principales: (1) TiO_2 puede ser fotoexcitado sólo bajo irradiación UV (con longitudes de onda menores a 387 nm), que constituye sólo del 3 al 5% del espectro visible; (2) el TiO_2 puro tiene una tasa de recombinación alta de electrones y huecos fotoinducidos, limitando su aplicación a escala comercial. Para ello, se han realizado grandes esfuerzos para desplazar la respuesta óptica de TiO_2 de la región UV a la región de luz visible para recoger la energía solar de manera más eficiente y para aumentar la eficacia de separación de pares de portadores de carga; a través de dopaje o depósito de NPs metálicas o no metálicas [66, 173].

La presencia de partículas metálicas como el Au, Ag y Cu en la superficie de TiO_2 pueden extender de manera efectiva su foto-actividad hacia la región visible debido a la separación eficaz de las cargas y reducir la brecha de bandas del TiO_2 . Por otra parte, este proceso también puede disminuir la rapidez de recombinación par electrón-hueco, lo que facilita la formación de radicales libres [50, 51]. Sin embargo, estos esfuerzos han brindado mejoras sólo modestas en la foto-actividad debido a que la absorción de luz visible no puede ser francamente relacionada con la velocidad de reacción, además de que las especies externas a menudo funcionan como centros de recombinación para los pares electrón/hueco foto-generados.



Varios estudios se han centrado en $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ como foto-catalizador para la oxidación de los contaminantes en presencia de luz UV [92]. Así, las nanopartículas (NPs) de metales nobles (Ag) son elegidos para la deposición superficial sobre TiO_2 para aumentar la separación de la carga, y para reducir la tasa de recombinación de pares electrón-hueco, y también reducir el intervalo de banda del dióxido de titanio [174-178]. Por lo tanto, la segunda parte del presente trabajo, se ocupa de la oxidación del ciprofloxacino como contaminante emergente y también se analiza la influencia del metal (Ag) en el catalizador TiO_2 aplicados en la degradación del ciprofloxacino bajo luz UV y visible.



CAPÍTULO 3



3. JUSTIFICACIÓN

El antibiótico es un producto farmacéutico no biodegradable por métodos convencionales en plantas de tratamiento de aguas residuales y, por ende, representa un problema grave en la contaminación del agua. Otro problema de contaminación en el agua es la presencia de altas concentraciones de iones metálicos. La detección de Al^{3+} en medio acuoso es importante pero difícil en comparación con otros iones metálicos debido a su poca coordinación, fuerte capacidad de hidratación y falta de características espectroscópicas [148, 179, 180]. Del mismo modo, controlar la presencia de cobre en el agua (nivel permitido 2.0 ppm, 30 mg) es un problema difícil debido al uso generalizado de Cu^{2+} (asociado a enfermedades neuro-degenerativas) en la industria y la agricultura. La novedad de esta investigación es que en la primera parte los antibióticos, especialmente ciprofloxacino, están siendo empleados para detectar los iones metálicos tales como Al^{3+} o Cu^{2+} . Dado que la espectrofluorimetría tiene alta sensibilidad, selectividad, rapidez y un fácil procedimiento operacional [28-30] en comparación con otros métodos de espectroscopia, puede emplearse eficientemente para detectar iones metálicos, aniones o moléculas orgánicas mediante la medición de cambios en la señal de fluorescencia. Así mismo, se analizó su aplicación a células de levadura, ya que son células eucariotas cuya similitud con células animales y humanas es mayor, en comparación con las células procariontas, como las bacterias. De igual manera, como aplicación adicional, la concentración de Cipro también puede determinarse mediante la técnica de fluorescencia añadiendo Al^{3+} o Cu^{2+} .

En la segunda parte se degrada el antibiótico ciprofloxacino, mediante el uso de TiO_2 y TiO_2 -Ag como catalizador bajo UV y luz visible, para analizar el efecto del dopaje con plata, elegida para aumentar la separación de la carga, reducir la tasa de recombinación de pares electrón-hueco, y también reducir el intervalo de banda del dióxido de titanio [174-178] lo que extiende de manera efectiva su foto-actividad hacia la región visible.



CAPÍTULO 4



4. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

4.1. Objetivos

4.1.1. Objetivo general

Analizar la propiedad electrónica de ciprofloxacino como quimiosensor para la detección de metales y su oxidación foto-catalítica mediante TiO_2 y $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ NPs bajo luz visible y UV.

4.1.2. Objetivos particulares

- Analizar propiedad electrónica (comportamiento espectral y fluorescencia).
- Estudiar ciprofloxacino como quimiosensor en fluorescencia para diferentes metales (pruebas de enlace, titulación, análisis estequiométrico e interferencia).
- Analizar presencia de puerta lógica.
- Emplear ciprofloxacino como quimiosensor para detección de Al^{3+} y Cu^{2+} en sistemas biológicos (levadura).
- Estudiar foto-degradación por TiO_2 y $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ a través de luz visible.
- Analizar el comportamiento de la cinética de degradación de ciprofloxacino.

4.2. Hipótesis

- Si Cipro funciona como detector para metales (Al^{3+} y Cu^{2+}) se puede emplear como quimiosensor para detección de estos metales en diversas aplicaciones.
- En caso de que $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ degrade eficientemente a Cipro a través de luz visible y UV, se puede emplear como foto-catalizador para la degradación de quinolonas en aguas residuales.



CAPÍTULO 5



5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

5.1. Materiales y equipos

Los reactivos químicos y solventes fueron adquiridos comercialmente de Sigma-Aldrich y usados sin purificaciones adicionales: ciprofloxacino, metanol, agua destilada, nitratos metálicos (Cd^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Sr^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Fe^{3+} , K^+ , Al^{3+} , Sm^{3+} , Ag^+ , Na^+ , Bi^{3+} , Ba^{2+} , Cr^{3+} , Zn^{2+} y Mn^{2+}), ácido clorhídrico, hidróxido de sodio, ter-butóxido de titanio (TBT), etanol, ácido acético, agua desionizada, nitrato de plata, carbonato de sodio. Así mismo, se utilizó como medio agar de Cisteína Tríptica (CTA, BIOXON) para el mantenimiento del cultivo celular y agar Müller Hinton (DIBICO) para la mezcla de dilución de inoculación.

Preparación de muestras biológicas: Todos los reactivos químicos fueron adquiridos de Sigma Aldrich y se utilizaron sin purificación adicional. Las cepas fueron obtenidas del Banco de Cepas (WFCC/WDCM-100), Facultad de Química, UNAM para el cultivo celular, y mantenidas en Medio Agar de Cisteína Tríptica (CTA, BIOXON) para el mantenimiento del cultivo celular y Agar Müller Hinton (DIBICO) para la mezcla de dilución de inoculación. Para todos los estudios biológicos, se utilizó agar Müller Hinton como medio de cultivo; como factores de crecimiento suplementarios se utilizaron peptona de carne (Sigma Aldrich) y glucosa (J. T. Baker) sin purificación adicional. Para el cultivo se utilizó una incubadora (BOEKEL).

5.2. Mediciones físicas

El espectrofotómetro UV-Vis (Perkin-Elmer Lambda 25) y el espectrofotómetro de fluorescencia (F-96 Pro) (Fig. 5.1) se emplearon para analizar las propiedades electrónicas y de fluorescencia de ciprofloxacino, así como para la detección de iones



metálicos. La fluorescencia confocal se realizó en un microscopio confocal Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania), con láser de diodo azul (50 mW, $\lambda = 405$ nm) y adquisición como xyz a una velocidad de 400 Hz. y procesadas utilizando el software de imagen Zen 2009 (Zen, Frickenhausen, Alemania). La oxidación de ciprofloxacino se controló midiendo los cambios de fluorescencia del sustrato mediante espectroscopía de fluorescencia (F-96 Pro). Se empleó cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, Varian Modelo Varian Pro-Star) acoplada con un detector UV (254 nm) para analizar el producto formado durante la oxidación ciprofloxacino. En el experimento de HPLC se usó una columna de fase inversa C-18 y la mezcla de disolventes (CH_3CN y H_2O 30:70) como fase móvil (Fig. 5.2).



Fig. 5.1: Equipo de fluorescencia para determinar propiedades electrónicas de ciprofloxacino, así como su cinética de degradación.



Fig. 5.2: Equipo HPLC para identificar intermediarios de la degradación de ciprofloxacino.

5.3. Propiedades físico-químicas de ciprofloxacino:

Es esencial eliminar el ciprofloxacino, el cual tiene fuertes propiedades antibióticas, del medio ambiente. La novedad del presente trabajo es que se elimina el antibiótico ciprofloxacino: 1) re-utilizado como detector de iones metálicos, y 2) degradado a su forma no tóxica.

A continuación se presenta la metodología experimental que se siguió para la eliminación de ciprofloxacino mediante las dos estrategias propuestas anteriormente.

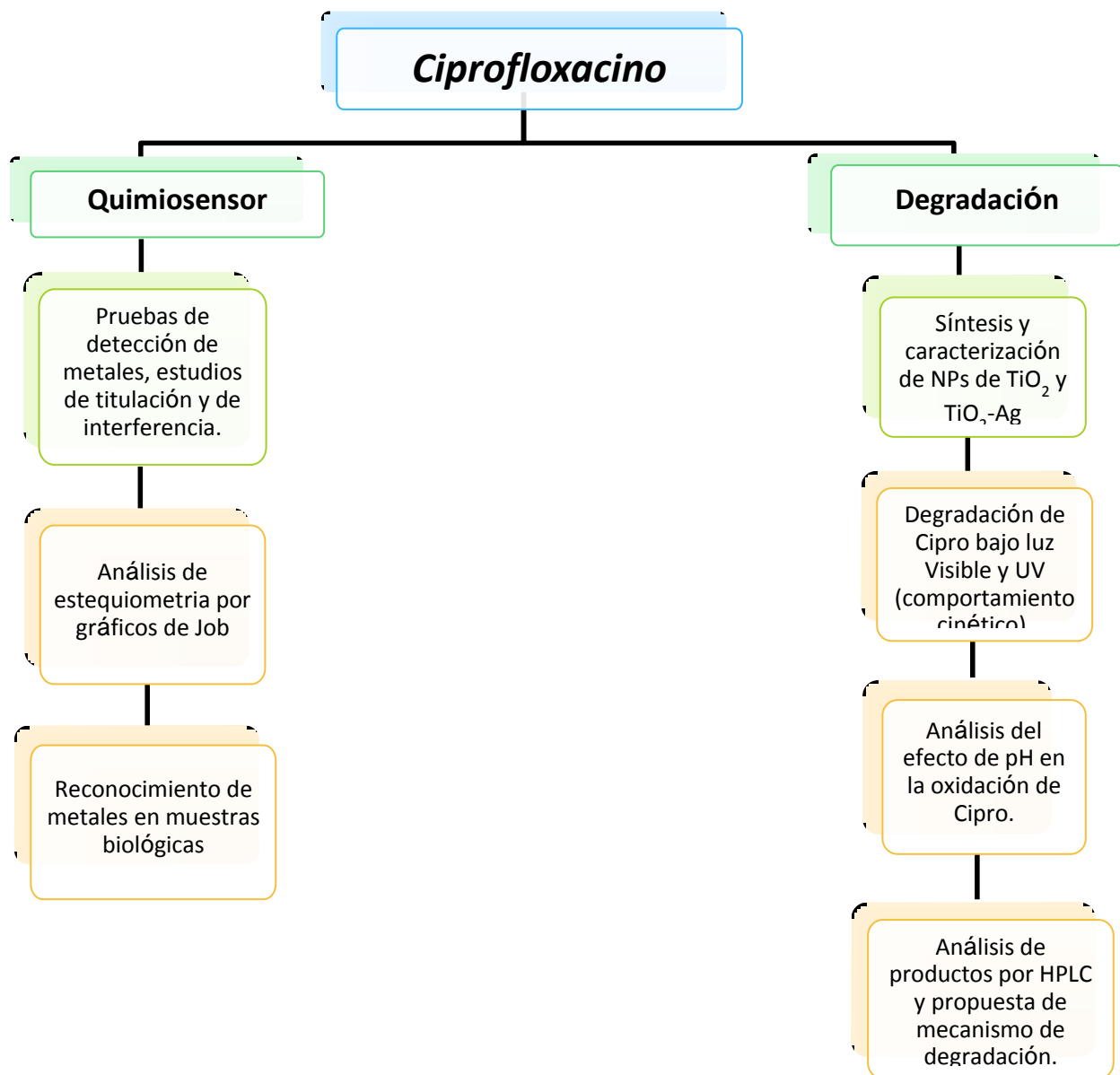


Fig. 5.3: Diagrama general del procedimiento experimental.

5.3.1 Ciprofloxacino como sensor químico:

Pruebas de reconocimiento de enlace con metales: La prueba de unión de metales fue realizada para los siguientes iones metálicos: Cd^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Sr^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Fe^{3+} , K^+ , Al^{3+} , Sm^{3+} , Ag^+ , Na^+ , Ba^{2+} , Bi^{3+} , Cr^{3+} , Zn^{2+} y Mn^{2+} . En el experimento, cada solución



de ion metálico (2.0 μ L, 0.1 M) fue agregada a Cipro (2.0 mL, 0.1 mM) en metanol, y después se midió la emisión de fluorescencia (360 a 720 nm).

Estudios de titulación (Cipro frente a iones Al^{3+} y Cu^{2+}): La selectividad de enlace del Cipro con iones Al^{3+} y Cu^{2+} se analizó mediante titulación espectrofotométrica; en donde la intensidad de emisión fluorescente se midió para cada adición sucesiva de Al^{3+} (de 0.0 a 0.075 mM) a Cipro (2.0 mL, 0.1 mM) y también de Cu^{2+} (de 0.0 a 0.59 mM) a Cipro (2.0 mL, 1.0 mM).

Estudios de titulación ([Cipro+ Cu^{2+}] frente a iones Al^{3+}): La selectividad de enlace para [Cipro+ Cu^{2+}] con Al^{3+} también se analizó mediante la medición de la emisión de la intensidad fluorescente para cada adición subsecuente de iones Al^{3+} (0.0 a 0.1 mM) a [Cipro (2.0 mL, 0.1 mM), + Cu^{2+} (0.05 mM)].

Análisis estequiométrico mediante gráfico de Job (Cipro con iones Al^{3+} y Cu^{2+}): La relación estequiométrica en la que se combinan Cipro y los iones Cu^{2+} y Al^{3+} se analizó mediante la medición de la emisión de la intensidad fluorescente para cada relación estequiométrica. Para cada ion se obtiene un gráfico de Job, el cual se realiza preparando una solución de cada ion (0.1 mM) y una de Cipro (0.1 mM). Para obtener la estequiometría se mantiene fijo el volumen en la celda (3.0 mL). En cada celda de ambos gráficos de Job se agrega primero el porcentaje correspondiente a la solución de Cipro y posteriormente el porcentaje correspondiente a la solución del ion metálico. Los porcentajes de ion metálico en las celdas fueron: 0, 6, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 92, 94, 96, 98 y 100%.

Análisis estequiométrico mediante gráfico de Job ([Cipro+ Cu^{2+}] con iones Al^{3+}): La relación estequiométrica en la que se combinan [Cipro+ Cu^{2+}] y Al^{3+} se analizó mediante la medición de la emisión de la intensidad fluorescente para cada relación estequiométrica. Inicialmente se prepara una solución de iones Al^{3+} (0.1 mM) y una de [Cipro (0.1 mM), + Cu^{2+} (0.05 mM)]. Para obtener la estequiometría se mantiene fijo el volumen en la celda (3.0 mL). En cada celda se agrega primero el porcentaje



correspondiente a la solución de [Cipro+Cu²⁺] y posteriormente el porcentaje correspondiente a la solución de Al³⁺. Los porcentajes de Al³⁺ en las celdas fueron: 0, 6, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 92, 94, 96, 98 y 100%.

Análisis de enlace competitivo o de interferencia (Cipro+Al³⁺ y Cipro+Cu²⁺): La posible interferencia de otros iones metálicos se estudió durante la selectividad del enlace de Cipro con Al³⁺. A 2.0 mL de la solución de la mezcla de Cipro (0.1 mM, 35.0 mL) + Al³⁺ (100.0 mM, 35.0 μL), se agregaron diversos iones metálicos (2.0 μL, 100.0 mM) de tal manera que la concentración final fue de 0.1 mM, y entonces se midió la emisión de fluorescencia en la región visible después de la excitación a 365 nm. Del mismo modo, para Cipro con Cu²⁺, se analizó la selectividad de unión y se añadieron diferentes iones metálicos (1.0 μL, 100.0 mM) a 2.0 mL de la mezcla de [Cipro (35.0 mL, 0.1 mM) + Cu²⁺ (100.0 mM, 17.5 μL)], y la concentración final fue de 0.05 mM.

Análisis de enlace competitivo o de interferencia ([Cipro+Cu²⁺] y Al³⁺): El enlace competitivo entre otros iones metálicos y [Cipro+Cu²⁺] con Al³⁺, fue estudiado. A 2.0 mL de la solución de la mezcla de [Cipro (0.1 mM, 35.0 mL) + Cu²⁺ (100.0 mM, 17.5 μL)] + Al³⁺ (100.0 mM, 35.0 μL) se le agregaron diversos iones metálicos (2.0 μL, 100.0 mM) de tal manera que la concentración final fue de 0.1 mM, y entonces se midió la emisión de fluorescencia.

Efecto de la temperatura en la emisión de fluorescencia para los diversos sistemas: Los efectos de la temperatura en la intensidad de fluorescencia para Cipro (0.1 mM), [Cipro (0.1 mM, 35.0 mL) + Cu²⁺ (100.0 mM, 17.5 μL)], [Cipro (0.1 mM, 35.0 mL) + Al³⁺ (100.0 mM, 35.0 μL)] y [Cipro (0.1 mM, 35.0 mL) + Cu²⁺ (100.0 mM, 17.5 μL)] + Al³⁺ (100.0 mM, 35.0 μL) fueron analizados. Para medir la intensidad de fluorescencia, se preparan celdas con 2.0 mL de cada sistema, utilizando un baño de hielo o un baño de agua caliente, según se requiera, en un rango de 5 a 50°C.



Reconocimiento de Al^{3+} y Cu^{2+} en muestras biológicas: La aplicación del quimio-sensor Cipro para los diversos sistemas en muestras biológicas, se resume en el siguiente diagrama (Fig. 5.4):

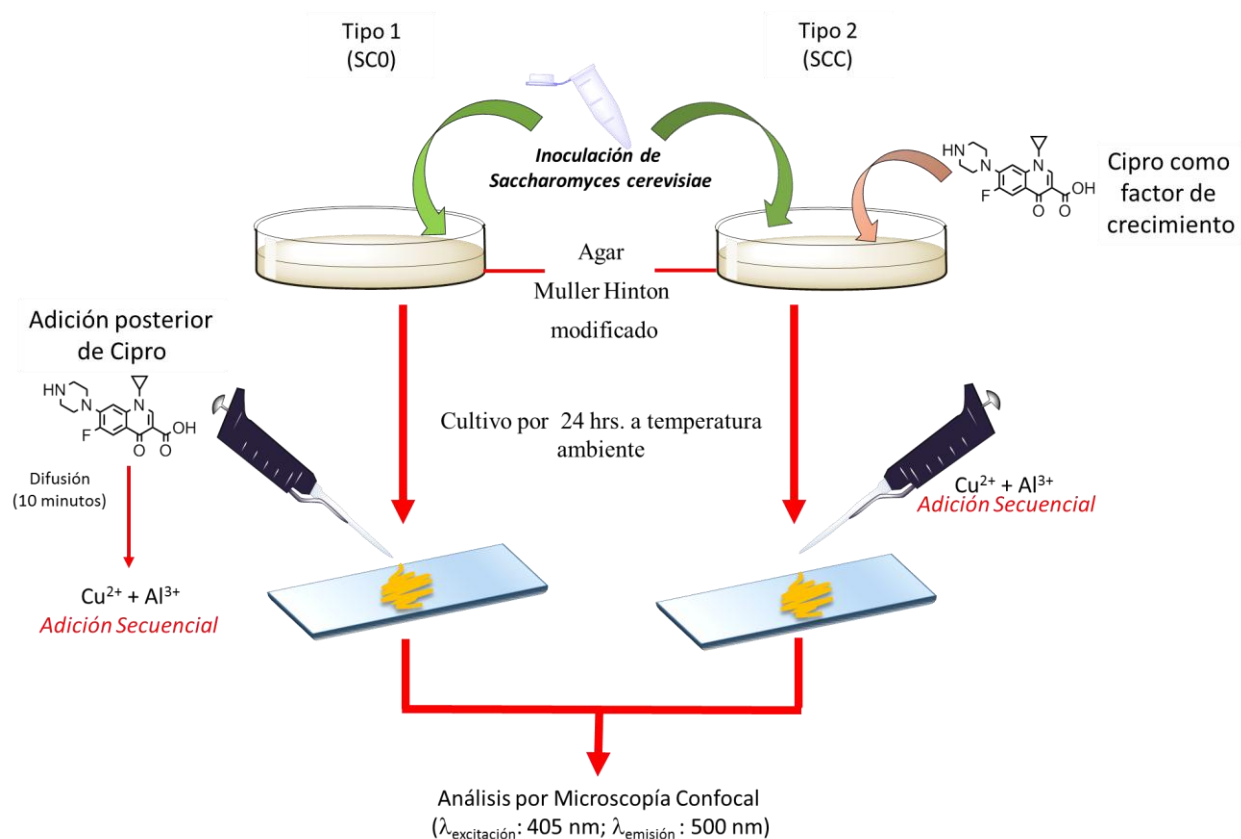


Fig. 5.4: Diagrama experimental en la aplicación de Cipro en muestras biológicas para el reconocimiento de Cu^{2+} y Al^{3+} .

Purificación de la célula: Las células de levadura *Saccharomyces cerevisiae* se obtuvieron a partir de cultivos disponibles comercialmente. La purificación de las cepas celulares se hizo a través de una modificación de los métodos previamente reportados [171, 181]. En un experimento típico, se tomaron 0.5 g de células secas y se añadió a tubos de ensayo esterilizados con 5.0 mL de agua destilada que contiene cierta cantidad de sacarosa (0.05 g/mL). El cultivo se dejó crecer durante dos horas y luego 250.0 μL se añadieron a una caja Petri que contiene agar Müller Hinton modificado con peptona de carne y glucosa (1.0% p/v de cada uno).



Difusión del quimiosensor en células de levadura: Con el fin de entender los procesos de difusión de ciprofloxacino dentro de las células de levadura, se llevaron a cabo diferentes experimentos. Anteriormente la levadura purificada se cultiva en dos entornos diferentes: *Saccharomyces cerevisiae* cultivado en agar que contiene ciprofloxacino (SCC) y levadura crecida sin ningún antibiótico añadido al agar (SC0). En ambos experimentos, se cultivaron células de levadura en agar Müller Hinton modificado como se describe antes. Una solución madre (5.0 mM) se preparó en un medio que contiene una mezcla de H₂O y etanol (90:10). A continuación se utilizó esta mezcla como fuente de Cipro para el cultivo celular, donde se añadieron 250.0 µL de antibiótico para las cajas de Petri que contienen el medio de cultivo modificado. Después de la adición de ciprofloxacino, el contenido se homogeneizó y se permite que se difunda en el agar durante diez minutos. Por último, la levadura se transfirió para el cultivo desde tubos de ensayo a cajas Petri e incubadas durante 24 horas a temperatura ambiente. En el caso de los cultivos libres de ciprofloxacino SC0, se aplicó un procedimiento similar; sin embargo, en este caso, se utilizó una solución de reserva que contenía sólo agua y etanol y se añadió Cipro únicamente antes de la observación bajo el microscopio confocal de barrido.

Pruebas de selectividad: La selectividad de ciprofloxacino hacia algunos iones metálicos, específicamente Cu²⁺ y Al³⁺, se analizó mediante el crecimiento de cierta cantidad de células de levadura en presencia de los iones metálicos. Se cultivaron células modificadas SCC según el procedimiento descrito anteriormente y después de 24 horas de cultivo, una carga de células se fija en un portaobjetos de vidrio; a este paquete de las células, se añadieron 50.0 µL de Cu²⁺ o Al³⁺ 0.1 mM en varias combinaciones.

5.4 Foto-degradación de ciprofloxacino mediante NPs de TiO₂-Ag bajo luz visible y UV.

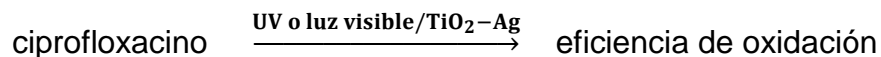
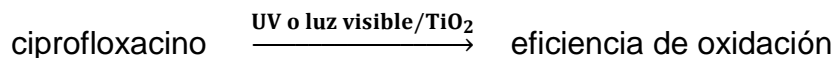
Síntesis y caracterización de TiO₂ NPs: Se prepararon como se reportó en la literatura [182]. Ter-butóxido de titanio (TBT) (4.5 mL) se disolvió primero en EtOH (41.0 mL), y



después se añadió lentamente (~ 1.0 mL / min) a la mezcla disolvente (100 mL, etanol: agua, 50: 50%) teniendo un pH de 3.0 ajustado por CH₃COOH. La solución resultante se agitó durante 2.0 horas para formar un sólido y después se dejó durante 8 horas a 20 °C, seguido por evaporación a 80 °C durante la noche en un horno; a continuación, se recogieron las muestras en un crisol e incineradas a 450 ° C durante 5 horas. Esta muestra fue caracterizada por difracción de rayos X (DRX) usando un difractómetro Rigaku RU300 (Radiación Cu K_α, λ = 0.154 nm), y microscopía de transmisión electrónica (TEM, por sus siglas en inglés) para analizar la morfología de las muestras mediante el uso de un microscopio de transmisión de electrones (TEM, JEOL 2010 200 kV) con espectroscopía de energía dispersiva (EDS, micro analizador).

Deposición de NPs de Ag sobre NPs de TiO₂ y su caracterización: El TiO₂ preparado se recubrió con Ag (1.0% p/p proporción) de acuerdo con una técnica ya reportada [183, 184]. TiO₂ (0.50 g) fue suspendido mediante sonicación en agua desionizada (10.0 mL), a la cual se agregó lentamente AgNO₃ (0.46 mL, 100.0 mM); la solución resultante se homogeneizó por agitación a 20 °C durante 30 min, y luego se añadió Na₂CO₃ (0.5 mL, 1,0% p/v) lentamente [185]. Esta muestra fue caracterizada por difracción de rayos X (DRX), microscopía de transmisión electrónica (TEM, por sus siglas en inglés) y espectroscopía de energía dispersiva (EDS).

Foto-oxidación de ciprofloxacino para ambos nano-materiales: La foto-eficiencia de los materiales fue probada en radiación UV y visible para la oxidación de ciprofloxacino como se muestra:





Se preparó una solución de concentración 1.0 mM de Cipro en MeOH. Se tomaron 7.5 mL de ésta solución, 22.5 mL de agua destilada, se agregaron 30 mg de catalizador (1.0 mg/mL) y se sonicó para disolver el catalizador. La mezcla resultante fue expuesta bajo luz UV o luz visible bajo agitación constante por un periodo de 60 minutos. La concentración de ciprofloxacino fue determinada mediante la técnica de fluorescencia. La eficiencia de oxidación de ciprofloxacino fue determinada de acuerdo a la Ecuación 1.

$$C_{\%} = 100 - \left(\frac{C_t \times 100}{C_0} \right) \quad (1)$$

$C_{\%}$ = porcentaje de concentración de ciprofloxacino después de la oxidación (eficiencia de oxidación); C_t = concentración de ciprofloxacino a diferentes tiempos; C_0 = concentración inicial de ciprofloxacino.

Efecto de pH en la oxidación de ciprofloxacino: Los efectos de pH fueron analizados bajo irradiación UV y visible para conocer el efecto en TiO_2 y con deposición de Ag en la eficiencia de la foto oxidación del ciprofloxacino. Los pH's manejados fueron: 3, 7 y 8. La solución inicial con catalizador presenta un pH inicial de 7. Para obtener los valores de pH básico o ácido se utilizaron soluciones de NaOH 1.0 M y HCl 1.0 M, respectivamente, así como tiras de pH.

Análisis HPLC de oxidación del ciprofloxacino: Se analizó el efecto del pH y la degradación de Cipro bajo luz Visible por 5 horas, para una mezcla de 26.25 mL de agua destilada y 3.75 mL de una solución de Cipro (2.0 mM) en MeOH, con 3.0 mg de catalizador TiO_2 -Ag (1.0 mg/10.0 mL). Una vez degradado, se filtró para retirar el catalizador, después se tomaron 20.0 μL en una microjeringa y se inyectaron a una Columna C18 ZORBAX por 10 minutos. El método utilizado para la lectura fue: Tioanisoles/MeOH y la mezcla usada fue Acetonitrilo : Agua en una relación 30:70.



CAPÍTULO 6



6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Ciprofloxacino como quimiosensor

Pruebas de reconocimiento de enlace con metales: En la prueba de unión de metales, realizada para los iones metálicos Cd^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Sr^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Fe^{3+} , K^+ , Al^{3+} , Sm^{3+} , Ag^+ , Na^+ , Ba^{2+} , Bi^{3+} , Cr^{3+} , Zn^{2+} y Mn^{2+} , Cipro fue excitado a 365 nm y se observó la emisión fluorescente correspondiente a 440 nm. Resultó que el antibiótico Cipro detecta simultáneamente los iones Al^{3+} y Cu^{2+} (Fig. 6.1); en la que existe una considerable extinción de la intensidad de fluorescencia (medida en u.a.) para Cu^{2+} y una fluorescencia mejorada para Al^{3+} , por lo que el antibiótico Cipro actúa como un quimio-sensor a través de los modos “activado” y “desactivado” para el reconocimiento de iones Al^{3+} y Cu^{2+} .

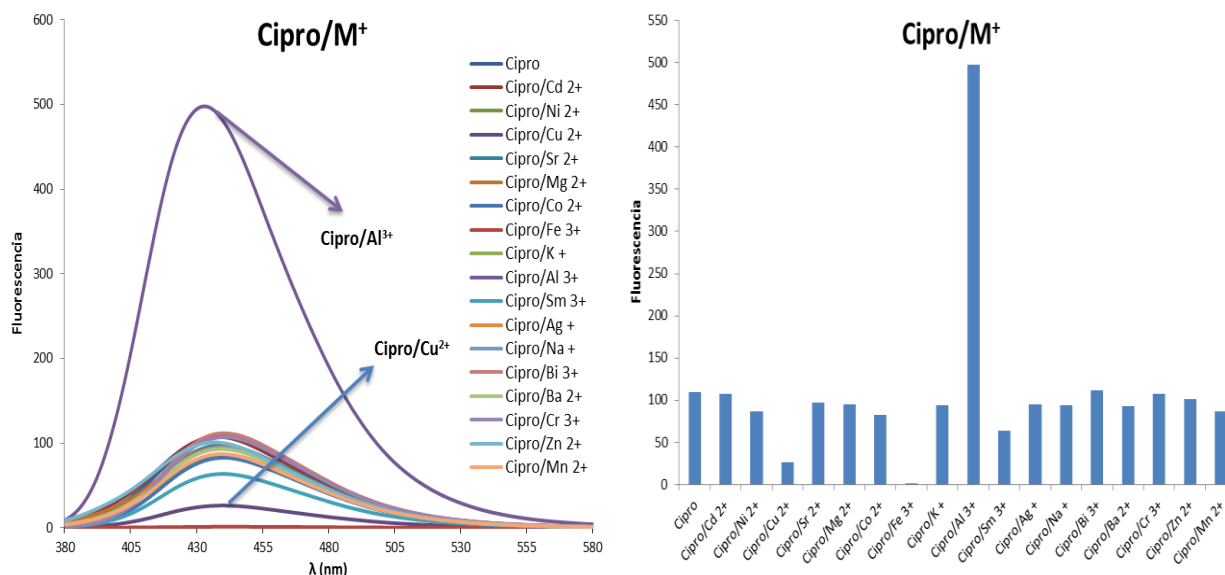


Fig. 6.1: Estudios de fluorescencia para pruebas de enlace de metales con Cipro (0.1 mM) en metanol con diferentes iones metálicos (2.0 μL , 100.0 mM).

NOTA: El eje de las ordenadas “Fluorescencia” tiene unidades arbitrarias (u. a.) de intensidad de fluorescencia.



Estudios de titulación de Cipro frente a iones Al^{3+} y Cu^{2+} : La selectividad de enlace del Cipro con iones Al^{3+} y Cu^{2+} se analizó mediante titulación espectrofotométrica (Fig. 6.2); en donde la intensidad de emisión fluorescente se midió para cada adición sucesiva de Al^{3+} (de 0.0 a 0.075 mM) a Cipro (2,0 mL, 0.1 mM) y también de Cu^{2+} (de 0.0 a 0.59 mM) a Cipro (2.0 mL, 1.0 mM). La intensidad del pico se desactivó considerablemente para Cu^{2+} , por lo tanto, la emisión de fluorescencia alrededor de 440 nm disminuye linealmente con el aumento de las concentraciones de Cu^{2+} (0.0 mM a 0.59 mM) y para Al^{3+} la intensidad de fluorescencia aumenta al aumentar la concentración en Cipro. Incluso con pequeñas cantidades de humedad, las sales de aluminio fácilmente pueden formar compuestos de aluminio hidroxilados, facilitando la interacción de OH^- , MeOH y H_2O con el ácido fuerte Al^{3+} para producir el complejo Al^{3+} .

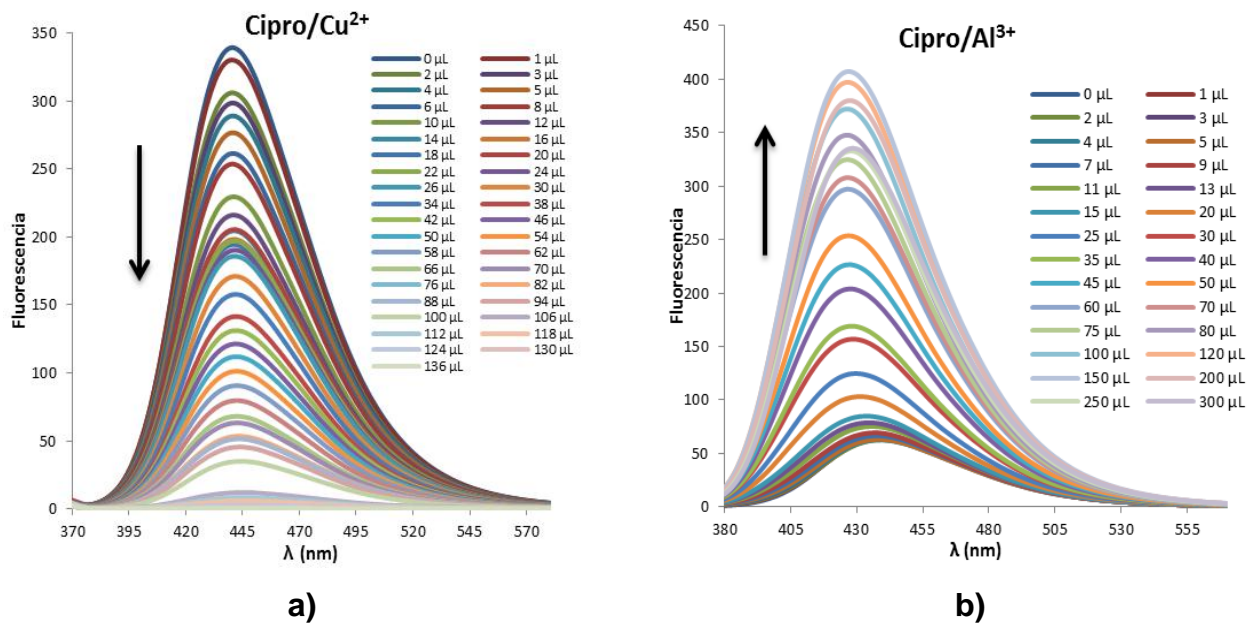


Fig. 6.2: Espectros de fluorescencia para estudios de titulación de **a)** Cipro (1.0 mM) con Cu^{2+} (desde 0.0 hasta 0.59 mM) y **b)** Cipro (0.1 mM) con Al^{3+} (desde 0.0 hasta 0.075 mM).

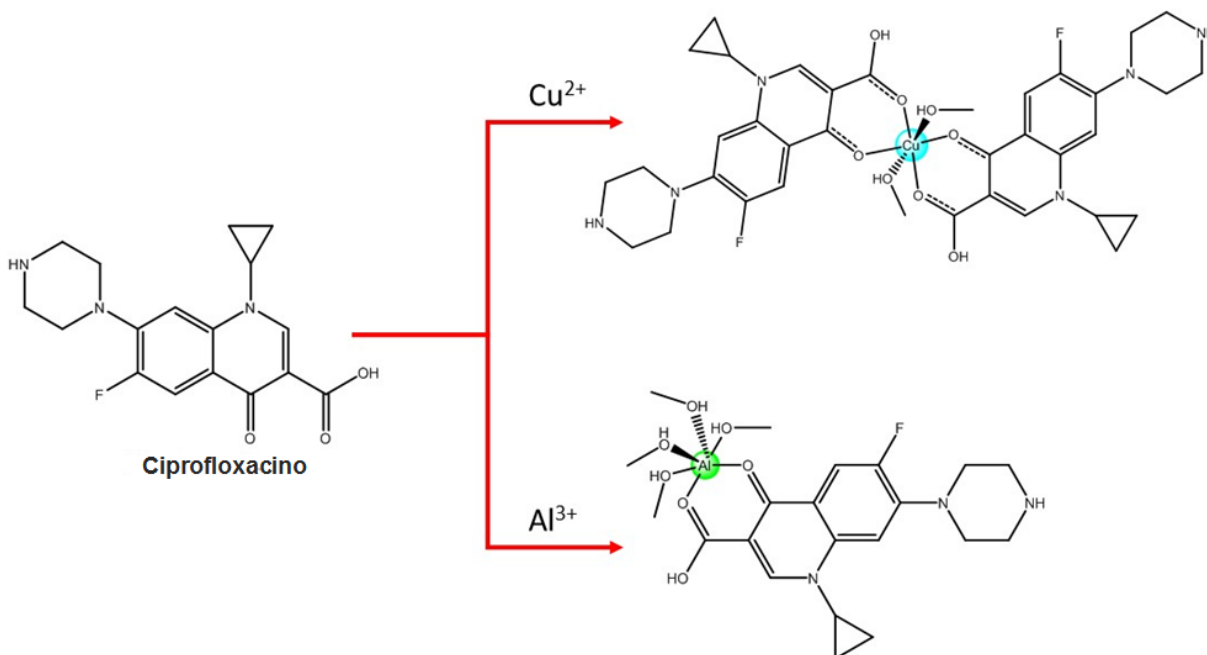


Fig. 6.3: Interacción de Cipro con Cu^{2+} y Al^{3+} .

Este estudio muestra que la interacción de Cipro con Al^{3+} o Cu^{2+} funciona como interruptores de fluorescencia activada o desactivada; esto es porque los iones metálicos involucran la formación de complejos (Fig. 6.3). Una gráfica de Stern-Volmer (Fig. 6.4a) fue elaborada usando los datos de extinción de la fluorescencia para entender el proceso de extinción. Esto demuestra que los contactos moleculares entre el Cipro (fluoróforo) y el ion metálico (desactivador) forman un complejo no fluorescente, causando que la fluorescencia se desactive. Además, el efecto de extinción sigue la ecuación de Stern-Volmer (Ecuación 2): a muy baja concentración de analito, la contribución de [Q] es menos prominente, produciendo un gráfico lineal pero en concentraciones más altas, el gráfico se desvía de la linealidad y se curva hacia arriba lo cual se asocia con la desactivación de la fluorescencia más estática que dinámica (Fig. 6.4a).

$$F_0/F = 1 + K_{sv}[Q] \quad (2)$$



F_0 = intensidad de fluorescencia en estado estacionario en ausencia del inhibidor;
 F = intensidades de fluorescencia en estado estacionario en la presencia del inhibidor;
 K_{sv} = constante de inhibición de Stern-Volmer, es decir, la eficiencia de inhibición;
 $[Q]$ = concentración del inhibidor $[Cu^{2+}]$.

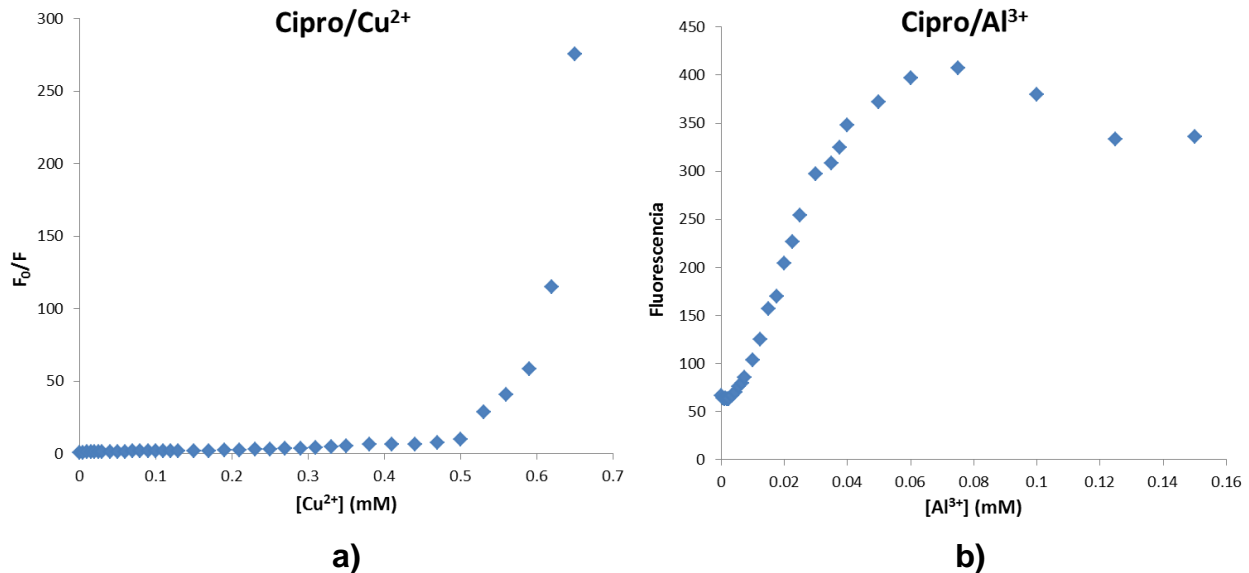


Fig. 6.4: a) Gráfica Stern–Volmer F_0/F vs. Concentración de $[Cu^{2+}]$; b) Aumento de fluorescencia frente a $[Al^{3+}]$.

Gráfica de Job para Cipro con Cu^{2+} : La relación estequiométrica de $[Cipro:Cu^{2+}]$ se determinó a través de la gráfica de Job. Sin embargo, puesto que la intensidad de fluorescencia se desactiva cuando se agrega Cu^{2+} a Cipro, la interacción se considera que sigue el proceso de transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET). Hemos adoptado el siguiente enfoque matemático para determinar la relación $Cipro:Cu^{2+}$. Si Cipro forma un complejo con Cu^{2+} completamente, es decir, ninguna molécula de Cipro está disponible en solución para la emisión de fluorescencia, puede representarse como sigue:

$$F = [Cipro] - \frac{1}{r_c} [Cu^{2+}] \quad (3)$$

F = Emisión de fluorescencia a 440 nm ; r_c = relación del complejo $[Cipro:Cu^{2+}]$.



Si consideramos que la concentración total (C_t) de $[Cu^{2+}]$ y $[Cipro]$ es constante.

$$C_t = [Cipro] + [Cu^{2+}] \quad (4)$$

$$[Cipro] = C_t - [Cu^{2+}] \quad (5)$$

La Ecuación 5 se sustituye en la Ecuación 3 de la siguiente forma:

$$F = C_t - [Cu^{2+}] - \frac{1}{r_c} [Cu^{2+}] \quad (6)$$

La relación (r_c) puede ser calculada mediante un nuevo arreglo de la Ecuación 6 igualada a cero:

$$r_c = \left(\frac{C_t - [Cu^{2+}]}{[Cu^{2+}]} \right)^{-1} \quad (7)$$

En el experimento, la emisión fluorescente se desactiva completamente después de la adición de Cu^{2+} (0.03 mM) (Fig. 6.5) y la suma de $[Cipro]$ y $[Cu^{2+}]$ está siendo considerada como constante (0.1 mM). La aplicación de los valores anteriores en la ecuación 8 arroja 0.492, lo que significa que Cipro (0.5 mmol) está formando un complejo con Cu^{2+} (1.0 mmol) con una relación equivalente de 2:1.

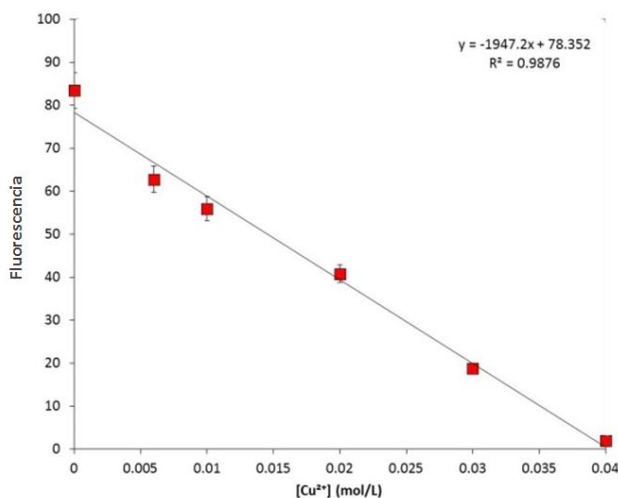


Fig. 6.5: Análisis de estequiometría: gráfica de Job para $[Cipro : Cu^{2+}]$.



Gráfica de Job para Cipro con Al^{3+} : La estequiometría para Cipro/ Al^{3+} se determina por el aumento de la intensidad de fluorescencia con el aumento proporcional de ion Al^{3+} contenido en la solución de Cipro, que resultó en aproximadamente 1.0 equivalentes, es decir, una relación estequiométrica [Cipro : Al^{3+}] de 1:1 (Fig. 6.6b).

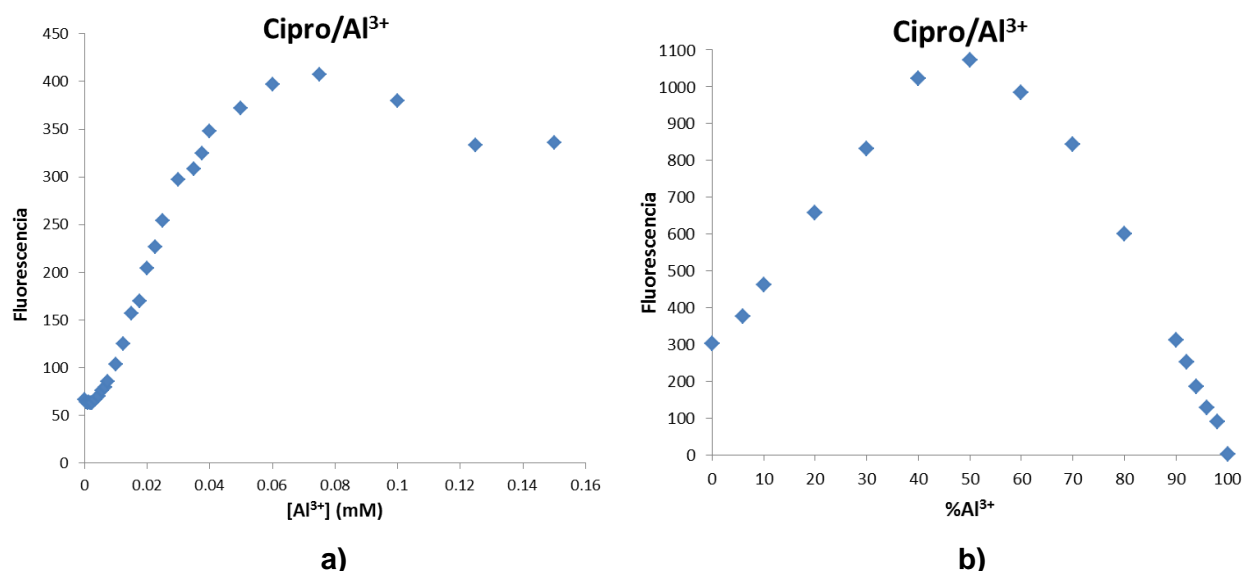


Fig. 6.6: a) Aumento de la fluorescencia al aumentar la concentración de Al^{3+} ; b) Gráfica de Job.

Análisis de Enlace Competitivo: Una posible interferencia de otros iones metálicos se estudió durante la selectividad del enlace de Cipro con Al^{3+} (Fig. 6.7). Se midió la emisión de fluorescencia en la región visible después de la excitación a 365 nm y los resultados muestran que existe una pequeña interferencia de iones Fe^{3+} durante el reconocimiento de Al^{3+} a través de Cipro (Fig. 6.7).

Del mismo modo, para [Cipro+ Cu^{2+}], se analizó la interferencia (Fig. 6.8) para diferentes cationes (concentración final de 0.05 mM). En el estudio, la adición de Cu^{2+} a Cipro seguido de Al^{3+} , presentó una mejora significativa de la fluorescencia. Por lo que estudiamos experimentos de tipo puertas lógicas.

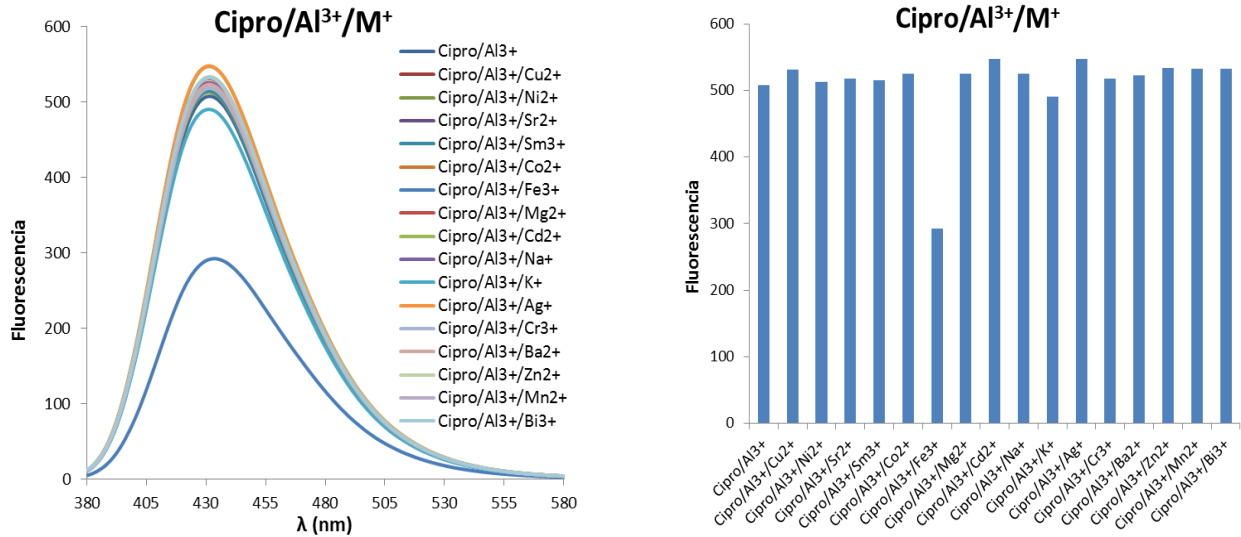


Fig. 6.7: Prueba de interferencias de enlace para el reconocimiento de Al³⁺ a través de Cipro (0.1 mM) con diferentes iones metálicos [100.0 mM, 2.0 μL].

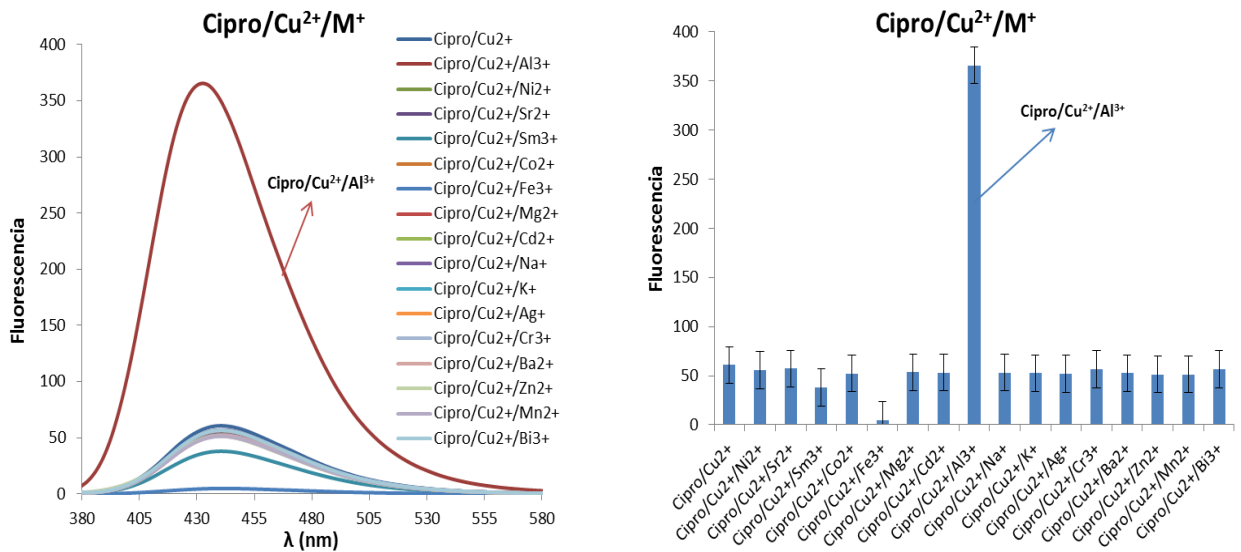


Fig. 6.8: Prueba de interferencias de enlace para el reconocimiento de Cu²⁺ a través de Cipro (0.1 mM) con diferentes iones metálicos [100.0 mM, 1.0 μL].

Estudios de Titulación de [Cipro + Cu²⁺] frente a iones Al³⁺: La selectividad de enlace para [Cipro+Cu²⁺] con Al³⁺ también se analizó mediante la medición de la emisión de la intensidad fluorescente para cada adición subsecuente de iones Al³⁺ (0.0 a 0.1 mM) a



[Cipro (2.0 mL, 0.1 mM), + iones Cu^{2+} (0.05 mM)]. La intensidad máxima fue incrementada considerablemente con el aumento de la concentración de Al^{3+} (Fig. 6.9), lo que establece que la emisión de fluorescencia alrededor de los 433 nm incrementa linealmente con un incremento de las concentraciones de Al^{3+} desde 0.0 mM hasta 0.1 mM. Los resultados sugieren que hay una puerta lógica de tipo AND para Cipro con la adición de Cu^{2+} seguido por Al^{3+} que es necesaria para el reconocimiento de Al^{3+} y Cu^{2+} en solución.

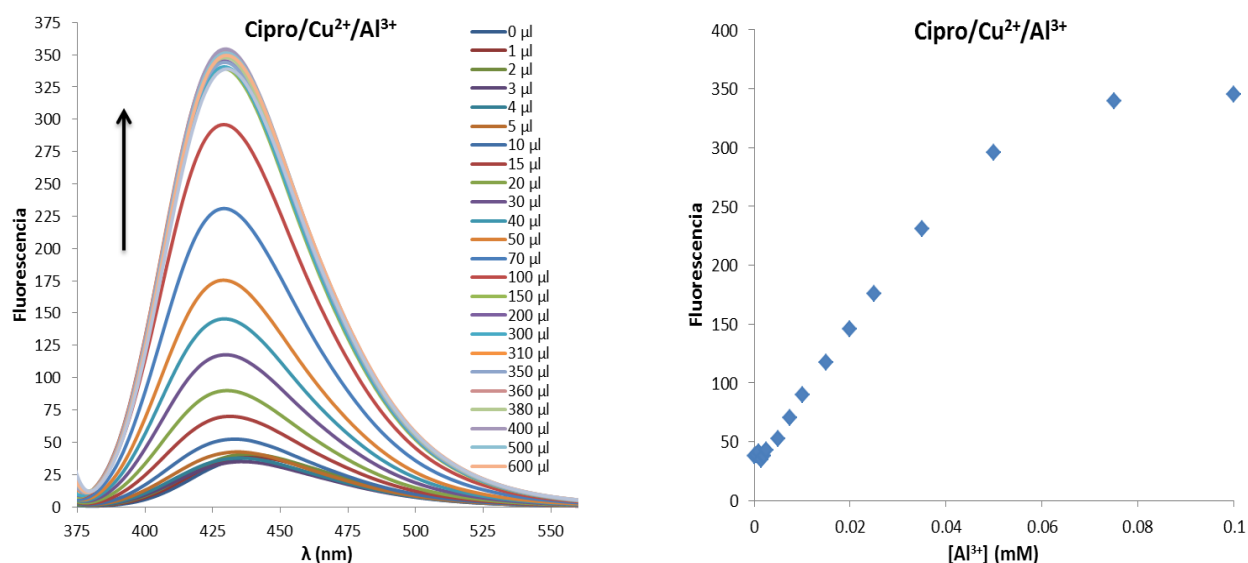


Fig. 6.9: Estudios de titulación de [Cipro + Cu^{2+}] frente a iones Al^{3+} .

Determinación de la estequiometría [Cipro + Cu^{2+}] frente a iones Al^{3+} : El método de Job fue empleado para determinar la estequiometría de la reacción entre [Cipro + Cu^{2+}] y Al^{3+} (Fig. 6.10). En el estudio, la intensidad de la fluorescencia aumenta proporcionalmente hasta aproximadamente 1:1 equivalentes durante la adición de iones Al^{3+} a Cipro, es decir, la relación de [Cipro + Cu^{2+}] con el Al^{3+} es de 1:1.

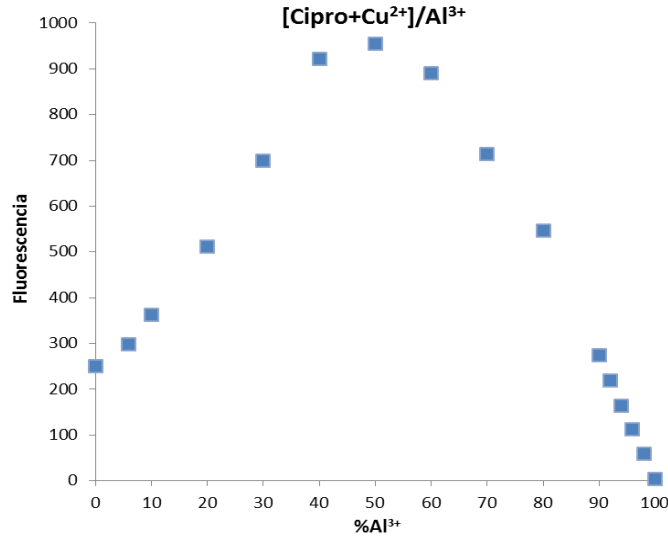


Fig. 6.10: Estequiometría mediante gráfica de Job para [Cipro + Cu²⁺] Vs. Al³⁺ en solución acuosa.

Así mismo, para el complejo [Cipro+Cu²⁺]+Al³⁺, se analizó la selectividad de unión para diferentes cationes con concentración final de 0.1 mM en solución. En el estudio, la adición de diversos metales al complejo [Cipro+Cu²⁺]+Al³⁺, no presentó modificaciones significativas de intensidades de fluorescencia, por lo que el complejo estudiado es estable.

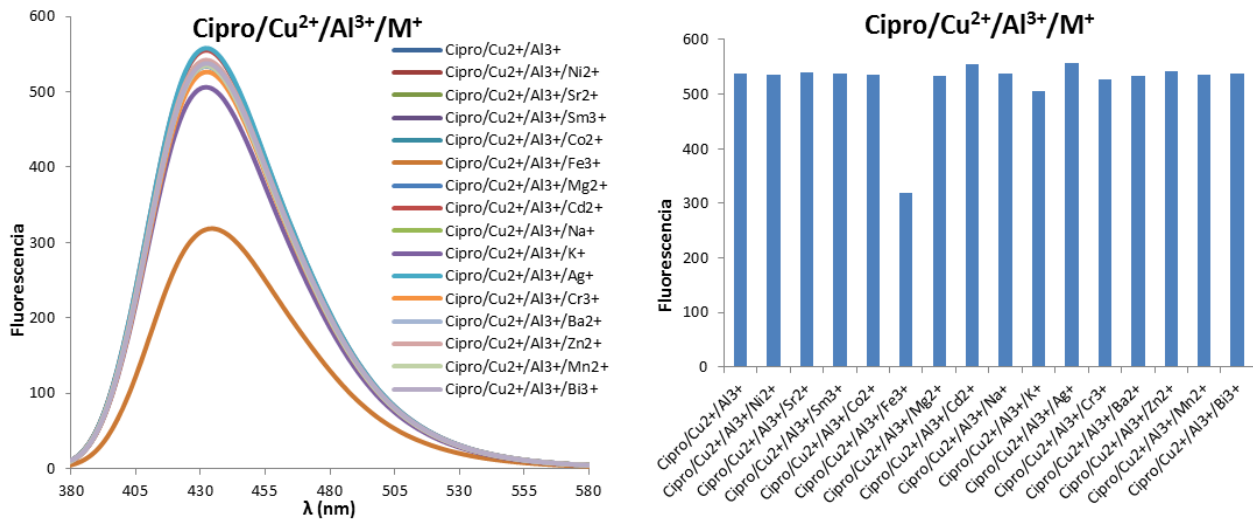


Fig. 6.11: Prueba de interferencias de enlace para el reconocimiento del complejo Cipro (0.1 mM) + Cu²⁺ (0.05 mM) + Al³⁺ (0.1 mM) con diferentes cationes [100.0 mM, 2.0 μL].



6.2 Sistema de puerta lógica:

Se ha observado que el enlace de Cipro con Cu^{2+} desactiva la intensidad de la fluorescencia a través del proceso de FRET mientras la emisión de fluorescencia se traslapa con la absorción de Cu^{2+} . Curiosamente, cuando se añadió Al^{3+} a [Cipro + Cu^{2+}], se observó una mejora significativa de la fluorescencia, desarrollando un sistema de puerta lógica secuencial. Esto significa que el mecanismo FRET implica una puerta lógica del tipo AND (A), donde el Cipro y Cu^{2+} son entradas, y la extinción de la fluorescencia es la respuesta (Salida 1). Una vez que este sistema ha sido activado, el complejo [Cipro + Cu^{2+}] y Al^{3+} funcionan como entradas para la salida en una puerta lógica del tipo AND (B), produciendo un aumento de la fluorescencia (Tabla 6.1).

Tabla 6.1: Tabla de verdad para el sistema de puerta lógica en reconocimiento secuencial de Cu^{2+} y Al^{3+} .

Puerta Lógica AND basada en FRET.			Puerta Lógica AND Secuencial.	
Entrada 1	Entrada 2	Salida 1 Entrada 3	Entrada 4	Salida 2
Cipro	Cu^{2+}	FRET	Al^{3+}	Fluorescencia
+	+	+	+	+
+	-	-	-	-
-	+	-	-	-
-	-	-	-	-

Curiosamente, sólo este orden secuencial de adiciones, es decir, Cu^{2+} a Cipro, seguido por Al^{3+} resulta en la mejora de la fluorescencia, y todas las demás combinaciones producen la extinción de ésta (Fig. 6.12 y Fig. 6.13). En el Paso 1, en una puerta lógica AND A, Cu^{2+} coordina con el grupo carboxílico del anillo quinolona (Cipro), exhibiendo una transferencia de energía FRET mediante la donación de los electrones excitados



de Cipro al ion metálico, lo que conduce a la extinción en las intensidades de fluorescencia. En el Paso II, (puerta lógica B), se genera otro sistema AND, es decir, Al^{3+} se puede unir a grupos amino del anillo de piperazina lo que aumenta la intensidad de fluorescencia. La adición de Al^{3+} a [Cipro + Cu^{2+}] aumenta la intensidad de la fluorescencia a través de la Transferencia de Electrones Fotoinducida (PET, por sus siglas en inglés) [186].

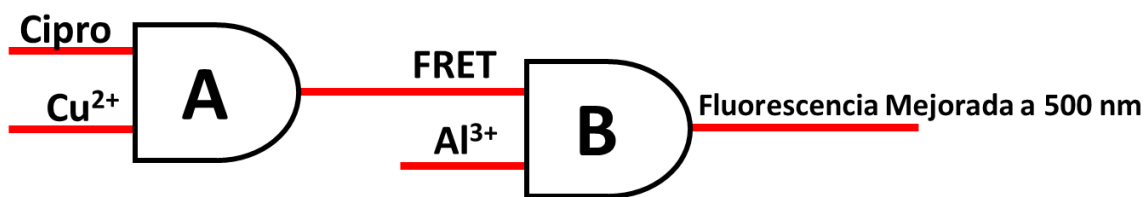


Fig. 6.12: Sistema de puerta lógica desarrollado para Cipro para la detección de Cu^{2+} y Al^{3+} .

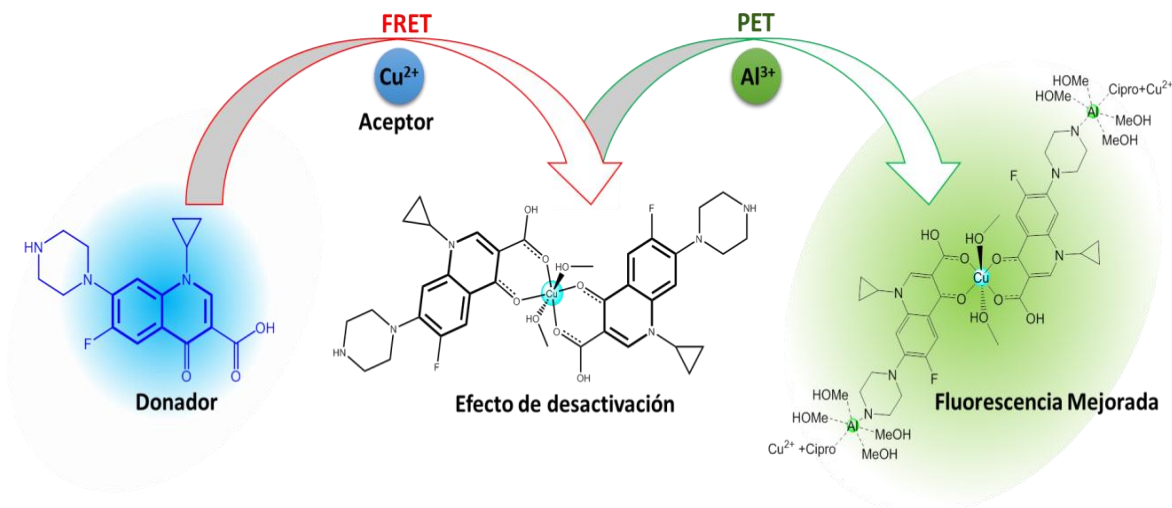


Fig. 6.13: Sistema de extinción y mejoramiento fluorescente basado en mecanismos sucesivos de FRET y PET.

Parece que el mecanismo FRET funciona en el Cipro uniendo el ión Cu^{2+} , es decir, cuando el fluoróforo es excitado, un electrón se excita desde LUMO a la de baja altura



HOMO (donador, fluoróforo). Inicialmente, la molécula (donador) es excitada, y cuando vuelve al orbital de estado basal, la energía se transfiere simultáneamente con la donación de electrones al aceptor en el estado excitado (Fig. 6.14). Esta transferencia de energía generalmente depende de dos factores que conducen a la desactivación de la fluorescencia: (1) el solapamiento del espectro de emisión de fluorescencia del donador (fluoróforo) y el espectro de absorción del aceptor (analito), (2) la orientación del donador y del aceptor.

Para el caso de Al^{3+} , la transferencia fotoinducida de electrones (PET) [187, 188] está operando para Cipro, es decir, la transferencia de electrones se bloquea cuando el receptor se coordina a un ion Al^{3+} (la inhibición del proceso de PET desde el receptor al fluoróforo), mejorando la intensidad de fluorescencia. Al^{3+} se une a sitios donadores de electrones del ligando, por consiguiente, el par solitario del electrón del $=\text{N}-$ desciende por debajo del HOMO del fluoróforo, entonces, el proceso de inhibición PET se produce con el realce de fluorescencia posterior.

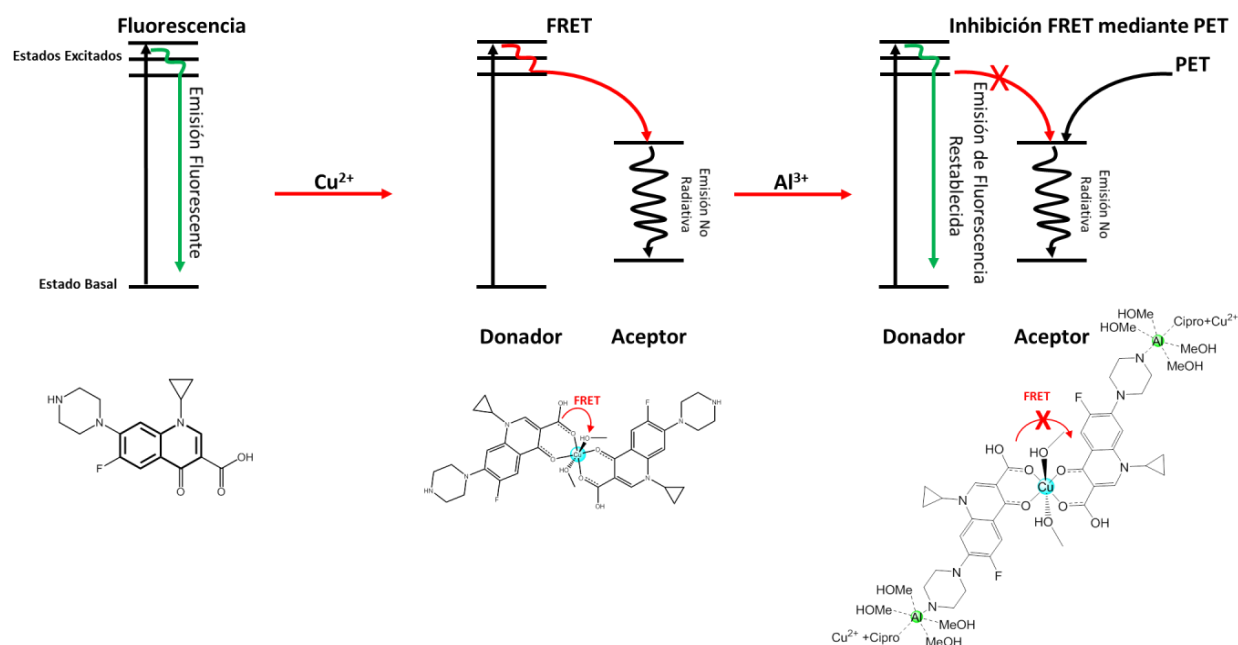


Fig. 6.14: Desactivación de la fluorescencia a través del mecanismo FRET del receptor después del enlace con Cu^{2+} , seguido por la ruta PET para $[\text{Cipro}+\text{Cu}^{2+}]$ con Al^{3+} para la mejora de la fluorescencia.



Efecto de la temperatura en la emisión de fluorescencia para los diversos sistemas: Los efectos de la temperatura en la intensidad de fluorescencia para el Cipro, [Cipro+Cu²⁺], [Cipro+Al³⁺] y [Cipro+Cu²⁺]+Al³⁺ fueron analizados (Fig. 6.15), y parece ser que para los sistemas Cipro y [Cipro+Cu²⁺], la intensidad aumenta, probablemente, debido a la formación del complejo de Cu²⁺ con Cipro que está siendo estabilizado con la temperatura. Mientras que para [Cipro+Al³⁺] y [Cipro+Cu²⁺]+Al³⁺, donde la estabilidad de estos sistemas se asocia sobre todo con la temperatura, como Al³⁺ es considerado un agente de coordinación deficiente, por lo tanto se espera que la intensidad disminuya con el aumento de la temperatura.

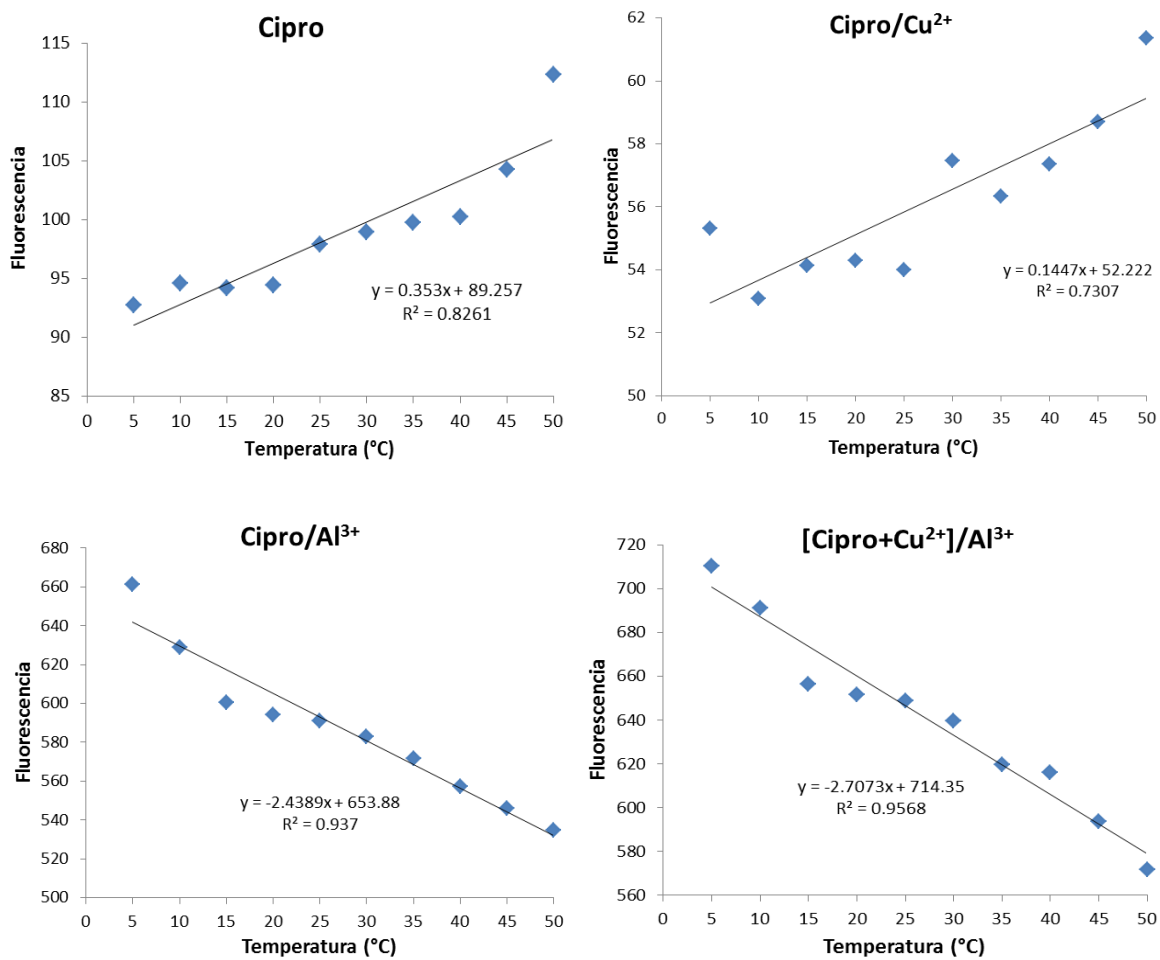


Fig. 6.15: Efecto de la temperatura en la emisión de fluorescencia.



Estas son las primeras respuestas de puertas lógicas del antibiótico fluoroquinolona como quimio-sensor de Cu^{2+} y Al^{3+} que están siendo aplicadas en las células eucariotas en vivo (*Saccharomyces cerevisiae*) y se pueden considerar como nuevos fármacos activos o marcadores biológicos o cuantificación de Al^{3+} y Cu^{2+} en ambientes acuáticos en la determinación de niveles anormales de múltiples analitos.

6.3 Reconocimiento de Al^{3+} y Cu^{2+} en muestras biológicas:

La actividad biológica de ciprofloxacino como un sensor químico fluorescente y selectivo se estudió para las células de levadura de *Saccharomyces cerevisiae* con el fin de determinar su actividad potencial como sensor químico para el reconocimiento de iones Cu^{2+} y Al^{3+} . Se estudiaron las diferentes características de los efectos de Cipro en el desarrollo celular a los mecanismos de difusión dentro de la célula.

Análisis de morfología de Sacharomyces cerevisiae: Se analizaron células de levadura *Sacharomyces cerevisiae* cultivadas (después de 24 horas) por microscopio (Fig. 6.16) y se observaron que las células están presentes en el rango de tamaño de 5.0 a 7.0 μm con forma regular ovalada, y luego fueron purificadas con el fin de obtener las células uniformes. Las células fueron cultivadas en dos formas diferentes con y sin Cipro, y después el comportamiento de las células cultivadas se analizó bajo el microscopio de fluorescencia después de la adición de diferentes combinaciones de los iones metálicos como se describe en la sección experimental (Tabla 6.2). Los resultados muestran que a excepción de *Sacharomyces cerevisiae*, otros organismos estuvieron ausentes debido a su potente naturaleza antibiótica de Cipro; por otra parte, el tamaño y la tasa de crecimiento de la levadura no fueron afectados por la presencia de Cipro en el medio de cultivo, resultando en que el brote de las células en tiempo real implica que Cipro no es tóxico para *Saccharomyces cerevisiae*.

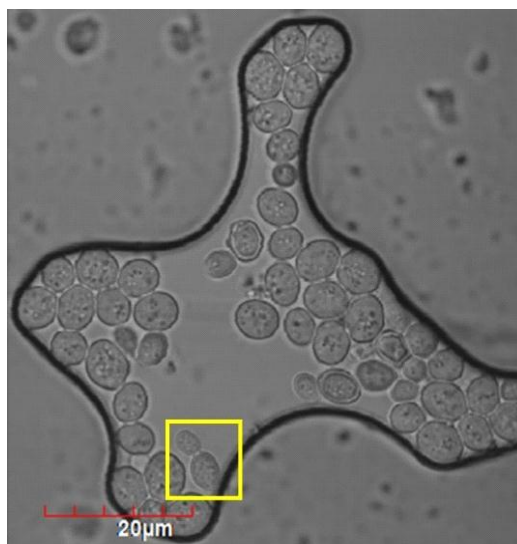


Fig. 6.16: Análisis de la morfología de la cepa de *Saccharomyces cerevisiae*; en el recuadro: células brotando.

Tabla 6.2: Reconocimiento selectivo de iones Cu^{2+} y Al^{3+} mediante *Sacharomyces cerevisiae* modificado con Cipro.

Células probadas	Longitud de onda de excitación (nm)	Cipro	Cu^{2+}	Al^{3+}	Fluorescencia (450-550 nm)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (SCC)	405 nm	+	-	-	Débil
		+	+	-	No
		+	-	+	No
		+	+ ^{1*}	+ ^{2*}	Fuerte
		+	+ ^{2*}	+ ^{1*}	No

* El número indica el orden de adición del ión metálico.

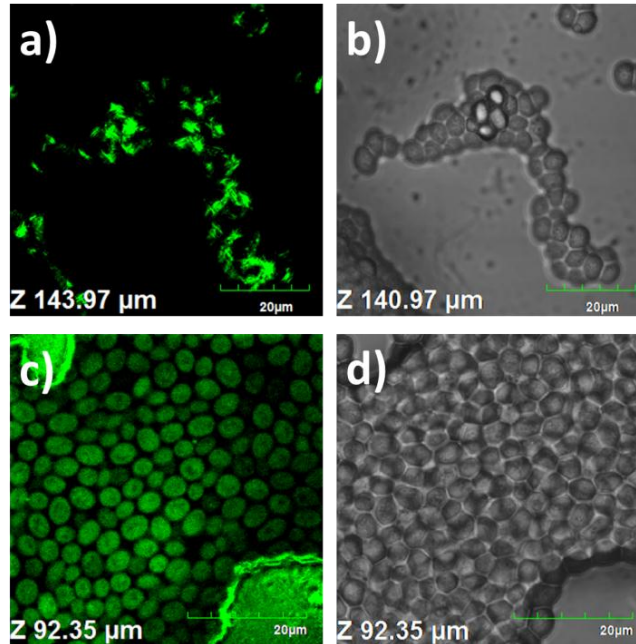


Fig. 6.17: Imágenes de microscopía confocal de *Saccharomyces cerevisiae*: Tipo 1: células cultivadas sin Cipro, **a)** imágenes de fluorescencia a 500 nm después de la adición de Cipro, Cu^{2+} y Al^{3+} a las células justo antes de los estudios confocales, **b)** la morfología de la célula bajo luz visible. Tipo 2: la célula crecida con imágenes de fluorescencia de Cipro **c)** a 500 nm después de la adición secuencial de Cu^{2+} y Al^{3+} , **d)** la morfología de las células bajo luz visible.

En el Tipo 1, donde las células se cultivaron primero y al que luego se añadieron Cipro, Cu^{2+} y Al^{3+} solamente justo antes de los estudios confocales en un orden secuencial, el fluoróforo (Cipro+ Cu^{2+} + Al^{3+}) estuvo presente en la membrana exterior de la célula, y no se observaron imágenes de fluorescencia dentro de las células (Fig. 6.17a). Esto significa que para las células que fueron cultivadas sin Cipro, el espesor total fue de 140.97 μm (hasta la superficie de la célula) que se determinó mediante un análisis de múltiples capas y no se observó ninguna respuesta de fluorescencia dentro de la célula (Fig. 6.17b). Cuando estas células cultivadas interactúan con Cipro, el espesor de la célula aumenta a 143.97 μm , con múltiples cuerpos con formas irregulares y emisión de fluorescencia a 500 nm después de excitación a 405 nm (Fig. 6.17c). Para el Tipo 2, las células fueron cultivadas junto con Cipro para difundir la molécula de antibiótico dentro



de la célula, y luego se añadieron Cu^{2+} seguido de Al^{3+} justo antes del estudio de microscopía confocal (Fig. 6.17d).

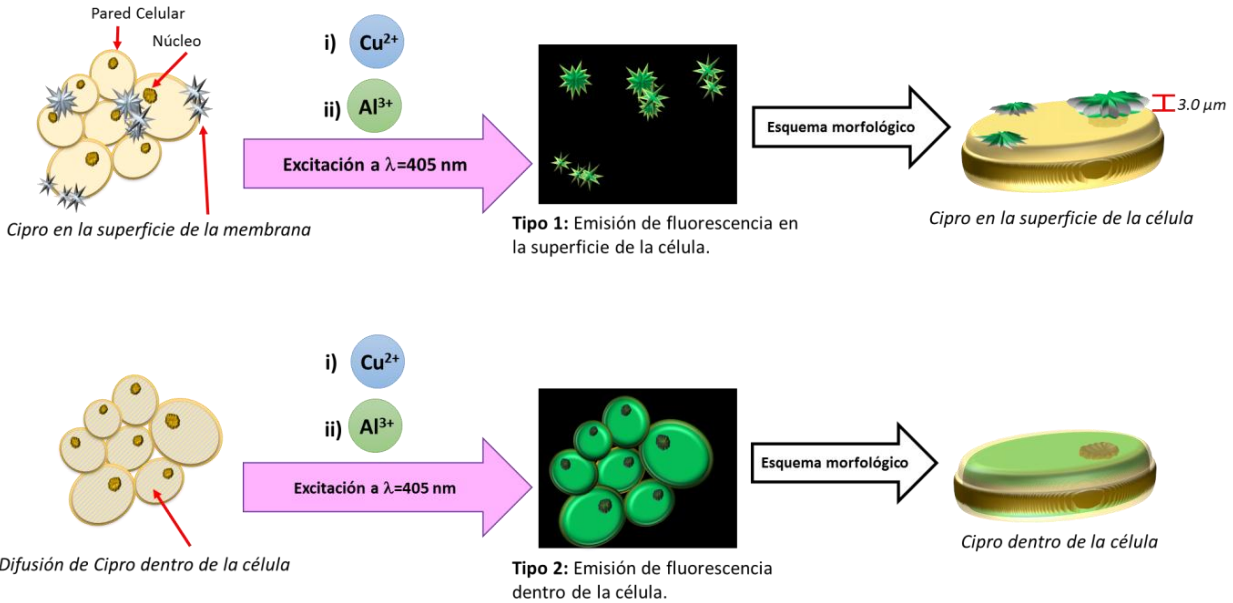


Fig. 6.18: Modo de interacción de ciprofloxacino con células *Sacharomyces cerevisiae*.

Los resultados muestran claramente que el sustrato fluoróforo está presente dentro de la célula, exhibiendo fluorescencia. Esto es consistente con la observación reportada de que la absorción de las fluoroquinolonas tales como Cipro dentro de células eucariotas (levaduras y animales) se facilita a través de la difusión acuosa (ADP). Cipro (base débil, $\text{pK}_{a1} \sim 6.8$) puede ser fácilmente protonado en condiciones ambientales en agua y se puede difundir en la membrana celular. Se sabe que durante el crecimiento de la célula también hay proceso de difusión de lípidos donde las moléculas de sustrato se unen a las proteínas, aminoácidos o polipéptidos que también podría facilitar la migración del fluoróforo en la membrana celular [171, 181].

Prueba de selectividad: Se realizaron estudios de fluorescencia selectiva en la interacción de *Saccharomyces cerevisiae* con diversos iones metálicos junto con Cipro (Tabla 6.2). Las células que fueron cultivadas con Cipro muestran una morfología clara



bajo luz visible (Fig. 6.19a), y se observó una emisión de fluorescencia pequeña bajo microscopía confocal a 500 nm después de excitación a 405 nm (Fig. 6.19b). El mismo comportamiento se observó en las células que fueron cultivadas con Cipro cuando estaban presentes en diferentes combinaciones de los iones metálicos bajo estudios confocales (Fig. 6.19c). Sin embargo, la fluorescencia fue mejorada significativamente para las células cuando interactuaron con Cu^{2+} (1.0 mM) seguido de Al^{3+} (1.0 mM) (Fig. 6.19d). Esto concuerda con los experimentos de puerta lógica, en los que solamente este orden de adición, es decir, Cu^{2+} seguido de Al^{3+} a Cipro, aumenta la intensidad de fluorescencia. Así, Cipro puede aplicarse como un quimiosensor potencial para el reconocimiento de Cu^{2+} y Al^{3+} en orden secuencial en los sistemas biológicos y para otras combinaciones de adiciones y se observa la fluorescencia en el modo desactivado.

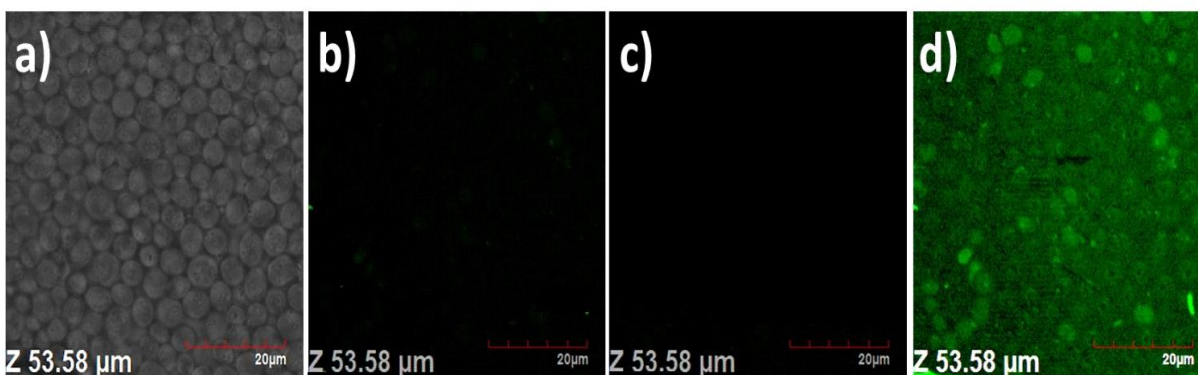


Fig. 6.19: Imágenes de microscopía confocal de Tipo 2: **a)** Morfología de células *Saccharomyces cerevisiae* cultivadas con Cipro bajo luz visible; **b)** células cultivadas con Cipro bajo microscopía confocal (excitación a 405 nm y emisión a 500 nm). **c)** células cultivadas con Cipro cuando interactúan con diferentes combinaciones de iones metálicos bajo microscopía confocal (emisión 500 nm, excitación a 405 nm; **d)** células cultivadas con Cipro cuando interactúan en orden secuencial con Cu^{2+} (1.0 mM) seguido por Al^{3+} (1.0 mM) bajo microscopía confocal (emisión 500 nm, excitación a 405 nm).

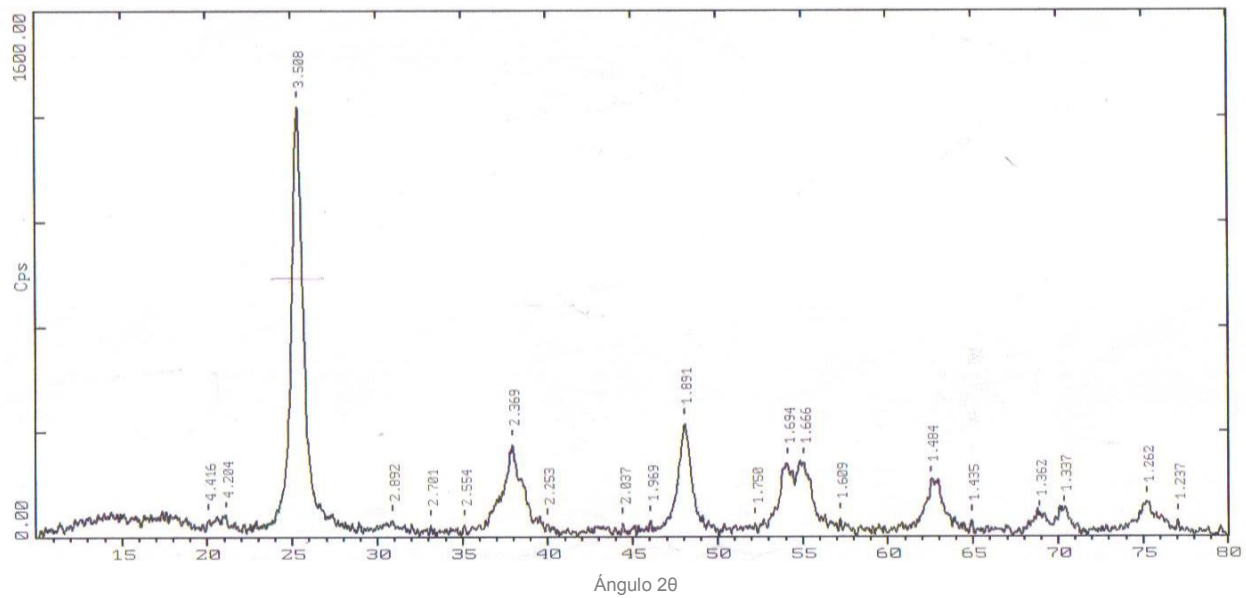


6.4 Ciprofloxacino y su oxidación foto-catalítica

6.4.1 Caracterización de NPs

Difracción de rayos X (DRX):

a) TiO_2 (anatasa)



b) TiO_2 -Ag

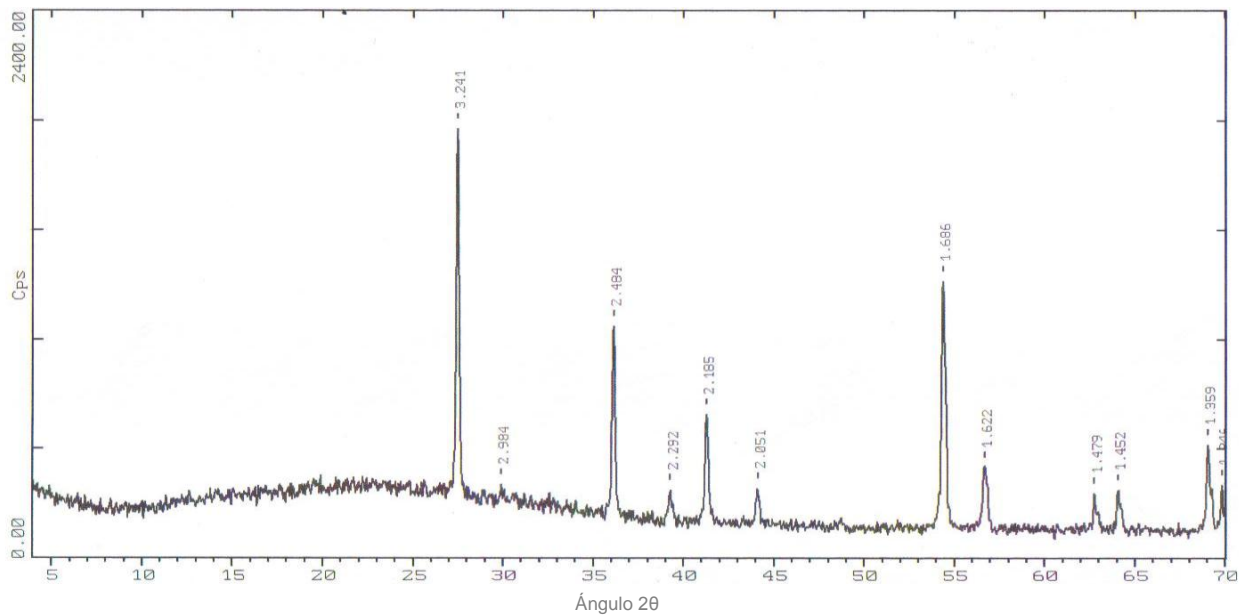


Fig. 6.20: Patrones DRX de TiO_2 y TiO_2 -Ag.



En la Fig. 6.20a, las nanopartículas de TiO₂ mesoporoso se presentan como anatasa. En el caso de TiO₂, las nano estructuras muestran picos característicos de la anatasa a $2\theta = 26.5$ (101), 36.8 (004), 47.2 (200), 55-56 (105) y (211), 63.5 (204) y 69.2 (116) [189], mientras que para las nanopartículas dopadas TiO₂/Ag (Fig. 6.20b) se observaron picos adicionales correspondientes a la plata a $2\theta = 30.5$. El tamaño de cristal de las muestras de TiO₂ preparadas se calculó a través de la ecuación de Scherrer-Debye:

$$\tau = \frac{0.9 \lambda}{\beta \cos \theta} \quad (8)$$

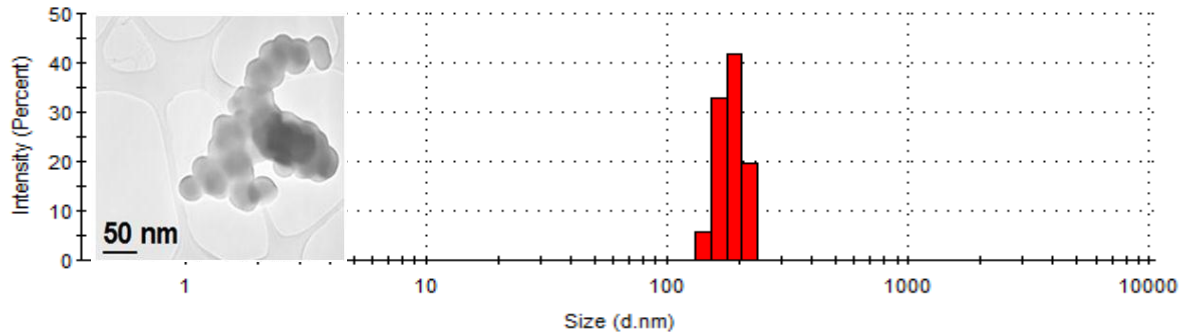
Dónde: τ = tamaño promedio de grano (nm); λ = longitud de onda de rayos X (k_{α} del átomo de Cu igual a 1.54 armstrongs); β = anchura total del pico a analizar a la mitad de su intensidad máxima, definida en radianes; θ = ángulo de Bragg. El tamaño calculado de las partículas fue 16.2624 para TiO₂ y 19.0457 nm para TiO₂/Ag mostrando que las partículas están formadas uniformemente.

Dispersión dinámica de luz (DLS):

Para llevar a cabo los análisis se utilizó un equipo Malvern ZetaSize series. En todos los casos la muestra fue previamente dispersada en agua en un baño ultrasónico durante 5 minutos. Se puede observar (Fig. 6.21) que en el caso de las NPs de TiO₂, hay una estrecha distribución de tamaño con un máximo alrededor de los 150 nm. Se puede observar que en esta muestra no hay otros tamaños asociados, lo cual corrobora la uniformidad en tamaño y forma de las partículas de TiO₂. En el caso de las NPs de TiO₂-Ag, se pueden observar dos diferentes máximos, en el primer caso, se observa un pico con un máximo de 60 nm que puede asociarse a NPs de Ag no depositadas sobre la superficie de TiO₂, en el caso del segundo máximo, se observa una estrecha distribución de tamaño que coincide con las NPs de TiO₂, por lo que se confirma la presencia de NPs asociadas.



a) TiO_2 (anatasa)



b) TiO_2 -Ag

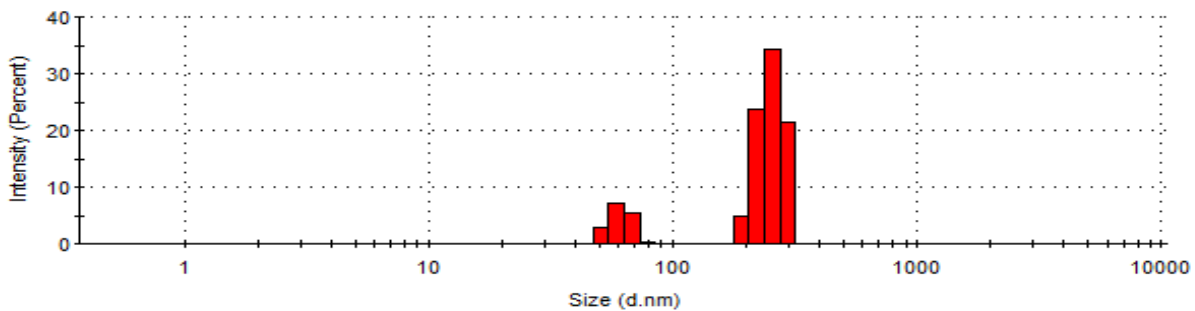


Fig. 6.21: Caracterización DLS de nano-materiales: **a)** TiO_2 (también se muestra caracterización por TEM) y **b)** TiO_2 -Ag.

Microscopía electrónica de transmisión (TEM):

Los análisis de microscopía electrónica de transmisión fueron realizados en un equipo JEOL 2010 con una aceleración de 40 kV. En estos análisis se pudo determinar la morfología de las nanopartículas de TiO_2 y los compositos de TiO_2 -Ag. Se puede observar en las imágenes (Fig. 6.22) que dentro de la matriz de baja densidad (TiO_2) hay pequeños puntos densos uniformemente distribuidos, estos puntos pueden ser identificados como NPs de Ag por su densidad y morfología. Se llevaron a cabo análisis de TEM de alta resolución (HRTEM) en los que se pudieron identificar granos individuales de TiO_2 que se distinguían por poseer un orden bien definido en su arreglo cristalino, esto nos permitió obtener imágenes de alta calidad del arreglo cristalino que fue identificado como TiO_2 en su fase anatasa.

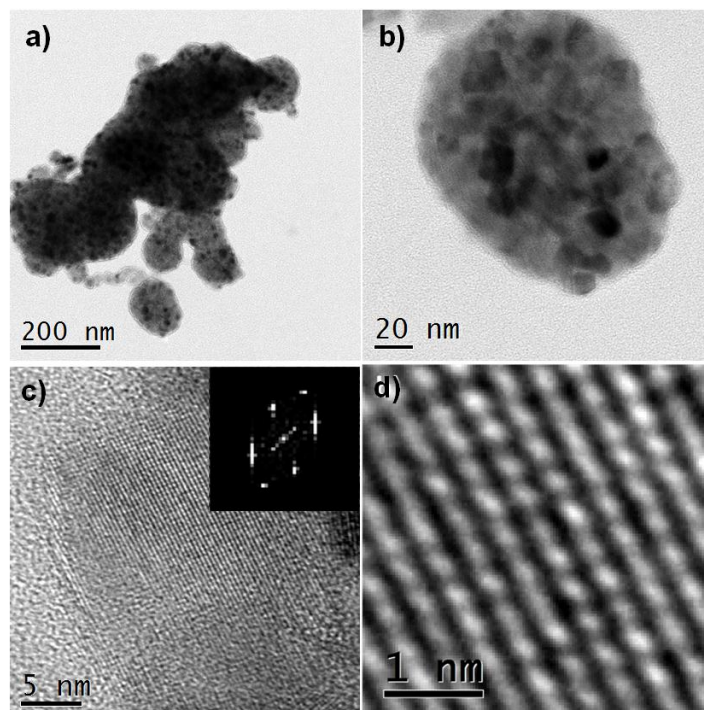


Fig. 6.22: Imágenes TEM para NPs de $\text{TiO}_2\text{-Ag}$: **a)** TEM x, **b)** TEM zoom, **c)** NP de Ag y **d)** HRTEM.

La forma precisa y el tamaño de las NPs de TiO_2 depende del método de síntesis; sin embargo, el TiO_2 usado en foto-catálisis cristaliza generalmente en una estructura cristalina anatasa tetraédrica estable.

Espectroscopía de Energía Dispersiva (EDS):

Los análisis EDS se realizaron midiendo 15 puntos diferentes de las muestras durante los estudios de TEM, mostrando la composición típica de TiO_2 [190]. Los resultados de la composición química de $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ con una resolución de sistema de 75eV y tipo de radiación de electrones K fueron: O (%elemental: 28.38; %atómico: 56.86), Ti (%elemental: 58.76; %atómico: 39.32) y Ag (%elemental: 12.85; %atómico: 3.82) con tipo de radiación de electrones L.



Espectroscopía UV-Vis

La foto actividad de los catalizadores preparados se investigó a través de la espectrofotometría UV-Vis de estado sólido (Fig. 6.23) y el cálculo teórico de band gap fue realizado a través de la ecuación de Einstein-Plank (Tabla 6.3). El catalizador TiO₂ mesoporoso muestra una basorbancia típica en la región UV ($\lambda < 400\text{nm}$) sin ninguna actividad en la región visible. Las NPs de Ag tienen una resonancia de plasmon superficial alrededor de los 400 nm. Sin embargo, la extensión en el pico de absorción se debe a los estados de energía adicionales dados por los orbitales d en el átomo Ag entre la banda de valencia y la banda de conducción del TiO₂. Los espectros de absorción muestran que los catalizadores dopados preparados tienen una eficiencia mejorada bajo radiación luminosa debido a que los estados de energía extra inducidos por el metal noble dentro del intervalo de banda de TiO₂ conducen a la extensión del par e^-/h^+ .

Tabla 6.3: Cálculo de band gap teórico para catalizador TiO₂ y TiO₂-Ag.

Material	TiO ₂	TiO ₂ /Ag	Teórico (anatasa)
Long. de onda máxima ($\lambda = \text{nm}$)	366	2.43	3.20
Bandgap (eV)	3.51	2.42	3.2

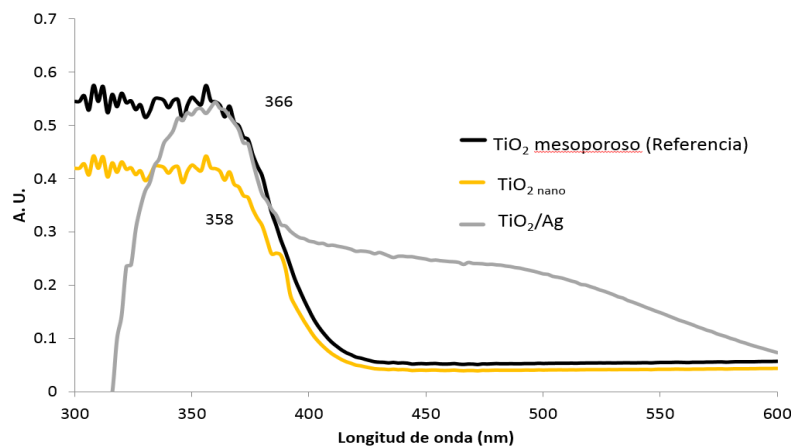


Fig. 6.23: Análisis de foto-actividad en el espectro UV-Vis de catalizadores TiO₂ y TiO₂-Ag.



6.4.2 Degradación de ciprofloxacino por TiO₂ o TiO₂-Ag mediante luz UV o Visible. Cinética de oxidación del ciprofloxacino

Degradación de ciprofloxacino bajo luz UV mediante NPs de TiO₂ o TiO₂-Ag.

Los espectros de fluorescencia obtenidos durante la degradación del ciprofloxacino catalizada con TiO₂ o TiO₂-Ag a diferentes pH's (pH 3, 7 y 8) y bajo luz UV, se muestran en la Fig. 6.24 y Fig. 6.25. Los espectros de fluorescencia para ambos catalizadores muestran que no todos presentan el mismo comportamiento. A pH 3 se observa el mayor cambio en los picos conforme avanza el tiempo y presenta los valores de fluorescencia mayores en todo el experimento con TiO₂, mientras que con TiO₂-Ag, a este mismo pH, no hay mucho cambio en los picos conforme avanza el tiempo y que la fluorescencia varía (sigue poco la tendencia de aumentar conforme lo hace el tiempo). Para pH 7 con catalizador TiO₂ se tiene poca variación en la fluorescencia, y por el contrario se observa una disminución respecto a los tiempos iniciales, pero con catalizador TiO₂-Ag los picos se separan un poco más aunque en los primeros minutos de la reacción se observa que la fluorescencia disminuye y después vuelve a aumentar (posible error experimental). A pH 8, para ambos catalizadores, se observa una mayor separación entre los picos y una buena tendencia (aumenta la fluorescencia conforme el tiempo aumenta) aunque el pico máximo se encuentra en intensidades muy bajas de fluorescencia.

La cinética de oxidación del ciprofloxacino se obtuvo a partir de los espectros de fluorescencia anteriores, tomando para cada tiempo el punto máximo de fluorescencia obtenida. Los gráficos de Ln [C/C₀] frente al tiempo para los pH's probados con TiO₂ (Fig. 6.24) y TiO₂-Ag (Fig. 6.25) dieron una línea recta, lo que sugiere que la reacción es de pseudo primer orden en el ciprofloxacino, y la pendiente de la gráfica, que corresponde a la constante de velocidad de reacción, es directamente proporcional a la concentración de ciprofloxacino. La velocidad de reacción de este modo está dada por:

$$-kt = \ln\left(\frac{C}{C_0}\right) \quad (9)$$



Donde k = constante de velocidad de reacción; C y C_0 = concentraciones de ciprofloxacino en un tiempo determinado y al tiempo inicial, respectivamente.

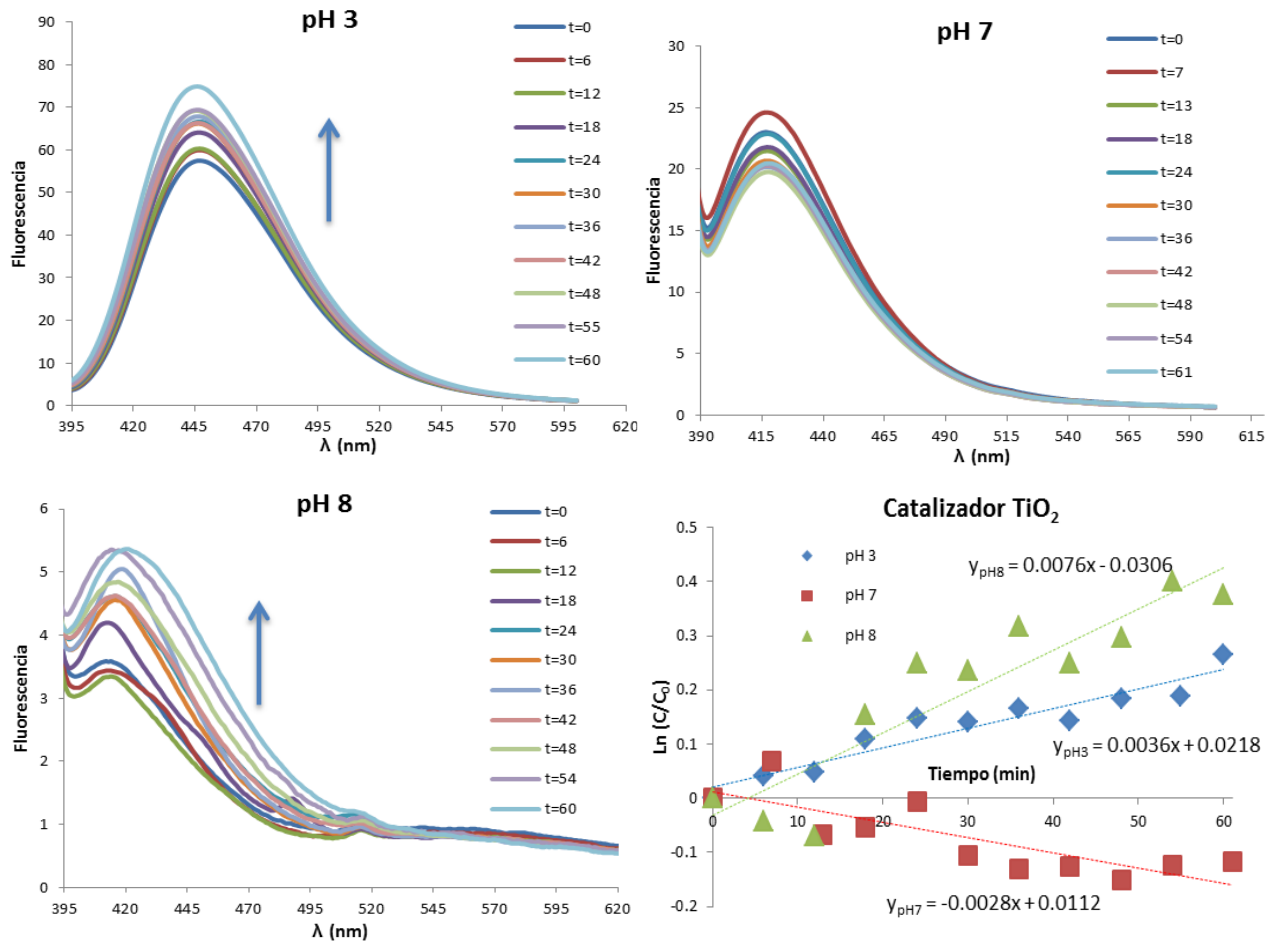


Fig. 6.24: Espectros de fluorescencia a distintos pH's de la degradación de Cipro con TiO_2 como catalizador bajo irradiación UV, así como su cinética de primer orden.

Los gráficos de la cinética de primer orden para ambos catalizadores arrojan que la mayor pendiente, y por ende la velocidad de oxidación mayor, se obtiene a pH 8. Para el catalizador TiO_2 se puede observar que a pH 7 se obtuvo una mayor dispersión en los datos y la pendiente es negativa, contrario a lo obtenido para pH 3 y 8. Con TiO_2-Ag , para pH 3 la intensidad de fluorescencia se mantuvo prácticamente constante, por lo que la pendiente es muy pequeña y a pH 7 se observa una mejor tendencia en los datos y un ligero aumento en la pendiente a diferencia de pH 3. Las longitudes de onda



(λ) a las que se apreció la máxima intensidad de fluorescencia para pH 3, 7 y 8 fueron: 447, 417 y 414 nm, respectivamente, para TiO_2 ; y para $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ 450, 443 y 420 nm, respectivamente.

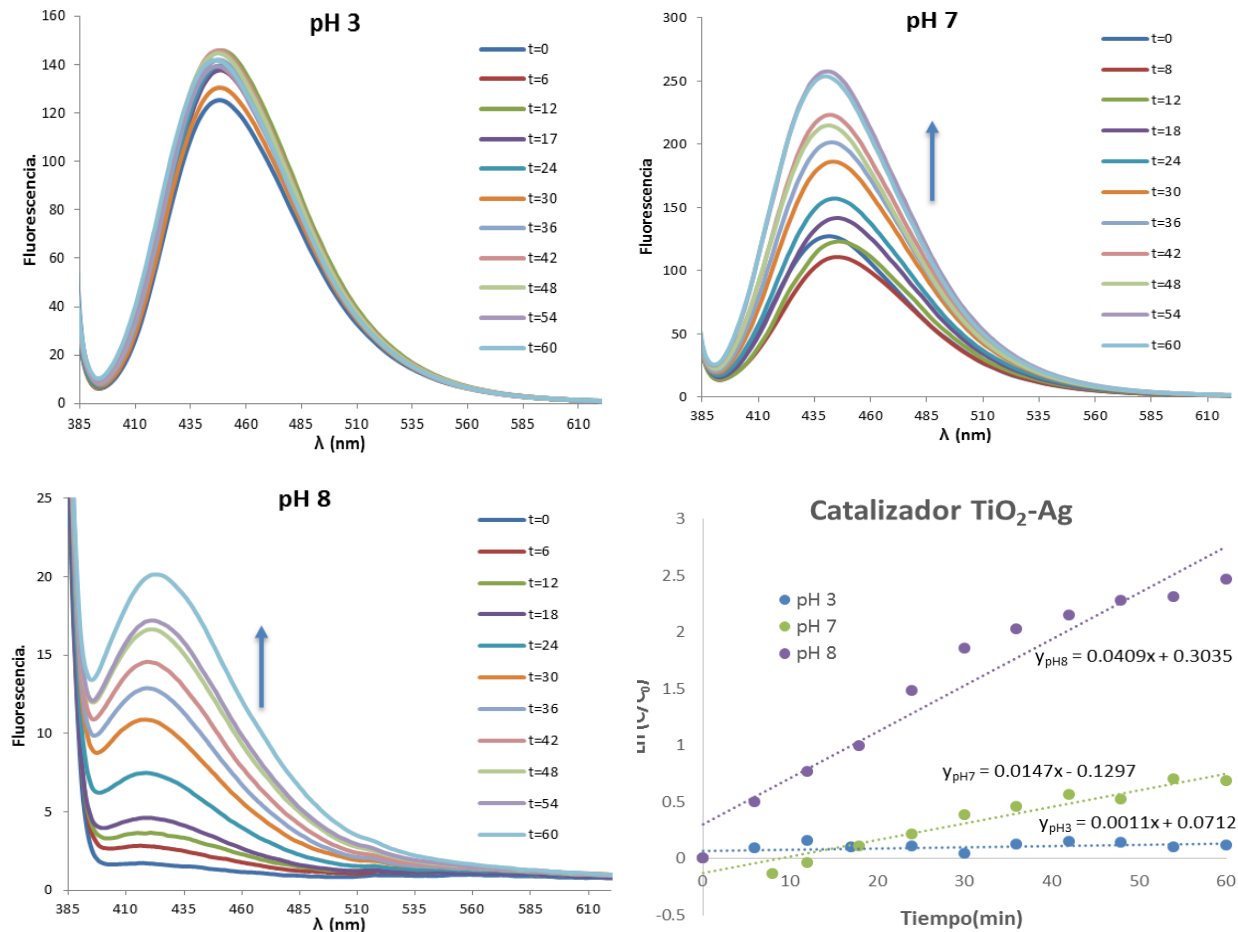


Fig. 6.25: Espectros de fluorescencia de la degradación de Cipro con NPs de $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ e irradiación UV y su cinética de primer orden a distintos pH's.

Resumiendo el efecto del catalizador en la degradación de Cipro bajo luz ultravioleta (Tabla 6.4) se tiene que la mejor degradación a pH 3 se da en presencia de catalizador TiO_2 , a pH 7 sucede cuando está presente $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ y a pH 8 la menor constante cinética sucedió con TiO_2 . La máxima degradación se da a pH 8 con catalizador $\text{TiO}_2\text{-Ag}$. Y de igual manera a pH 8 se tienen los valores de constante cinética más altos.



Tabla 6.4: Valores de la constante cinética de primer orden (min^{-1}) para la degradación de Cipro bajo irradiación UV.

	<i>pH 3</i>	<i>pH 7</i>	<i>pH 8</i>
TiO₂-Ag	0.0011	0.0147	0.0409
TiO₂	0.0036	-0.0028	0.0076

Degradación de ciprofloxacino bajo luz visible por TiO₂ o TiO₂-Ag

Para este experimento, además de ver el efecto del catalizador TiO₂-Ag y TiO₂ bajo luz visible a diferentes pH's, también se evaluó el efecto del calor (60 °C) que por sí misma emite la lámpara utilizada para luz visible después de cierto tiempo con TiO₂, para lo cual se hicieron dos experimentos: el primero sin ningún tipo de refrigeración y tal cuál como se usó para el catalizador TiO₂-Ag; y el segundo, también con TiO₂, utilizando refrigeración con el fin de mantener la temperatura constante (aprox. 20°C) (Fig. 6.26).



Fig. 6.26: Uso de refrigeración para mantener a temperatura constante (aprox. 20°C) la muestra de Cipro catalizada con TiO₂ bajo luz visible.



Los espectros de fluorescencia obtenidos de la degradación de ciprofloxacino catalizada con TiO_2 durante 60 minutos de radiación visible y sin refrigeración, así como su cinética de primer orden, se muestran en la Fig. 6.27, donde para todos los pH's existe una buena degradación de Cipro y la tendencia es la observada en los demás experimentos (incrementa la intensidad de fluorescencia conforme se incrementa el tiempo de exposición bajo luz visible). Nuevamente se aprecia una mejor degradación (mayor pendiente) a pH 8, y pH 7 y 3 mantienen su velocidad de reacción similar entre ambos. Las longitudes de onda (λ) a las que se apreció la máxima intensidad de fluorescencia para pH 3, 7 y 8 fueron: 445, 444 y 415 nm, respectivamente.

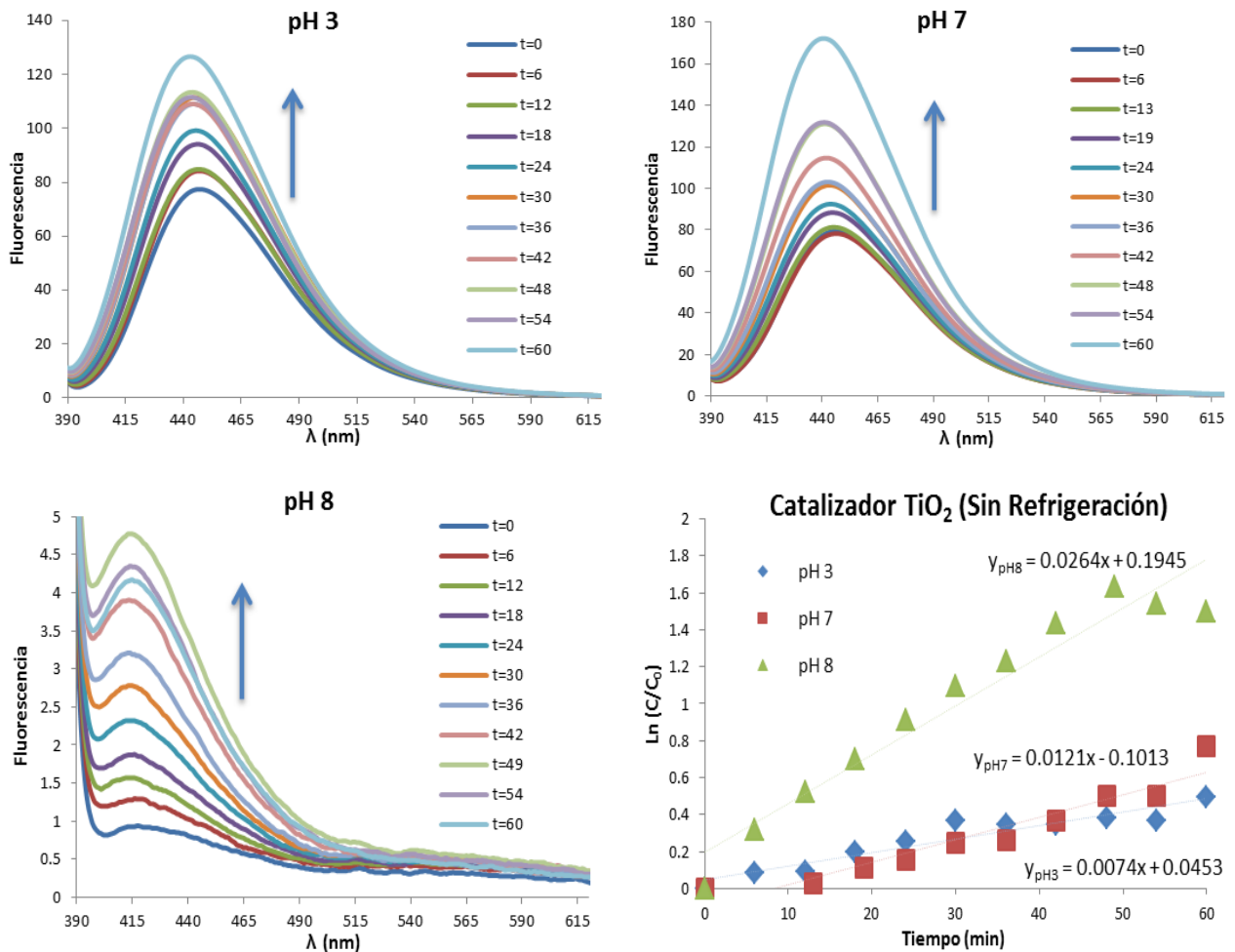


Fig. 6.27: Espectros de fluorescencia y cinética de primer orden de la degradación de Cipro a distintos pH's con TiO_2 como catalizador bajo irradiación visible y sin ningún tipo de refrigeración.

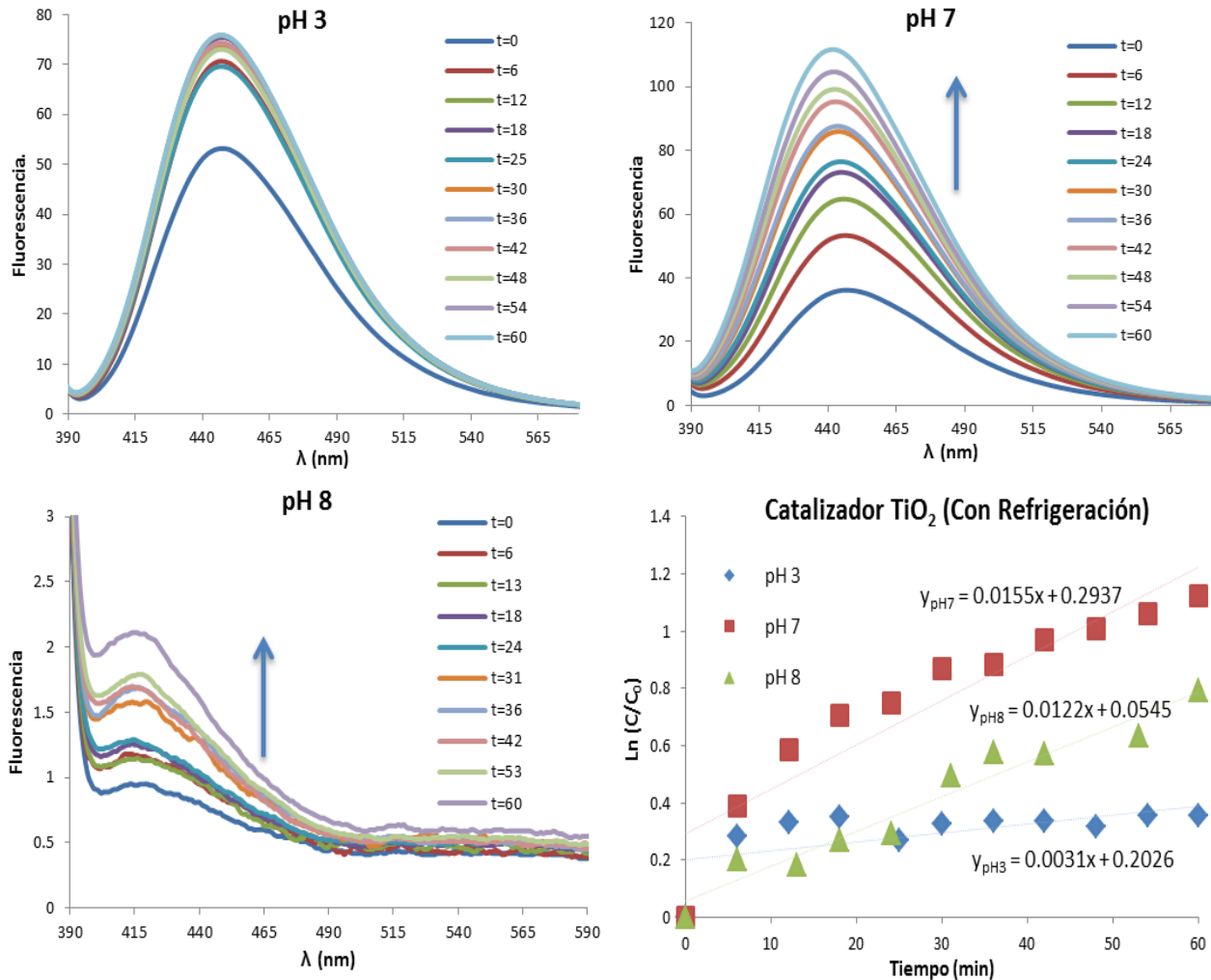


Fig. 6.28: Espectros de fluorescencia y cinética de primer orden de la degradación fotocatalítica de Cipro a pH 3, 7 y 8 con TiO_2 como catalizador bajo irradiación visible y con refrigeración.

La Fig. 6.28 muestra los espectros de fluorescencia controlando la temperatura manteniéndola constante ($20\text{ }^\circ\text{C}$, aproximadamente) usando refrigeración, y que, a pH 7 y 8, conforme aumenta el tiempo de degradación también aumenta la intensidad de fluorescencia, mientras que a pH 3 se observa un aumento en la fluorescencia a $t=6$ min pero después de ese tiempo se mantiene casi constante durante todo el tiempo de degradación. Para pH 8 se vuelve a tener intensidades de fluorescencia bajas, a diferencia de pH 7 donde se tienen las intensidades más grandes del experimento. Al



analizar la cinética de primer orden, a diferencia de otros experimentos, se observa la mayor degradación (mayor pendiente) a pH 7 y la menor degradación es a pH 3. Para los tres valores de pH se puede ver que los datos se encuentran un poco dispersos. Las longitudes de onda (λ) a las que se apreció la máxima intensidad de fluorescencia para pH 3, 7 y 8 fueron: 447, 445 y 417 nm, respectivamente.

En la Tabla 6.5, se resume el efecto de la temperatura bajo luz visible para el catalizador TiO_2 en la degradación de ciprofloxacino, donde el comportamiento de la degradación se ve modificado cuando la temperatura se mantiene constante, disminuyendo la constante cinética a pH 3 y pH 8 en casi la mitad de cuando no hay refrigeración. A pH 7, con refrigeración se aprecia un leve aumento en la constante cinética (posible error experimental). Nuevamente a pH 8, se observa la mayor degradación y no se ve afectado este efecto por la presencia o ausencia de refrigeración. En general, cuando no se usa refrigeración y, por consiguiente, la temperatura se eleva, se da la evaporación del solvente MeOH de la mezcla de solventes MeOH/ H_2O que se tiene como medio acuoso en el sistema; por lo que al aumentar la concentración de ciprofloxacino existe un aumento en la intensidad de fluorescencia.

Tabla 6.5: Comparación de los valores de la constante cinética de primer orden (min^{-1}) para la degradación de Cipro bajo luz visible catalizada por TiO_2 con refrigeración y sin ella.

pH	Sin Refrigeración	Con Refrigeración
3	0.0074	0.0031
7	0.0121	0.0155
8	0.0264	0.0122

Los espectros de fluorescencia para el catalizador $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ en la degradación de ciprofloxacino bajo luz visible y a distintos pH's (Fig. 6.29) muestran que a pH 3 se



observa que no hay mucho cambio en los picos conforme avanza el tiempo y que la fluorescencia no varía (sigue poco la tendencia de aumentar conforme lo hace el tiempo); para pH 7 los picos se separan un poco más y se muestra mejor la tendencia esperada; y a pH 8 se observa una mayor separación entre los picos y una buena tendencia (aumenta la fluorescencia conforme el tiempo aumenta) aunque el pico máximo se encuentra en intensidades muy bajas de fluorescencia. El gráfico $\ln(C/C_0)$ vs. tiempo a distintos pH's muestra que nuevamente se tiene la mayor pendiente (constante cinética) a pH básico, seguida de pH 7; pero los datos presentan una dispersión considerable para los tres valores de pH.

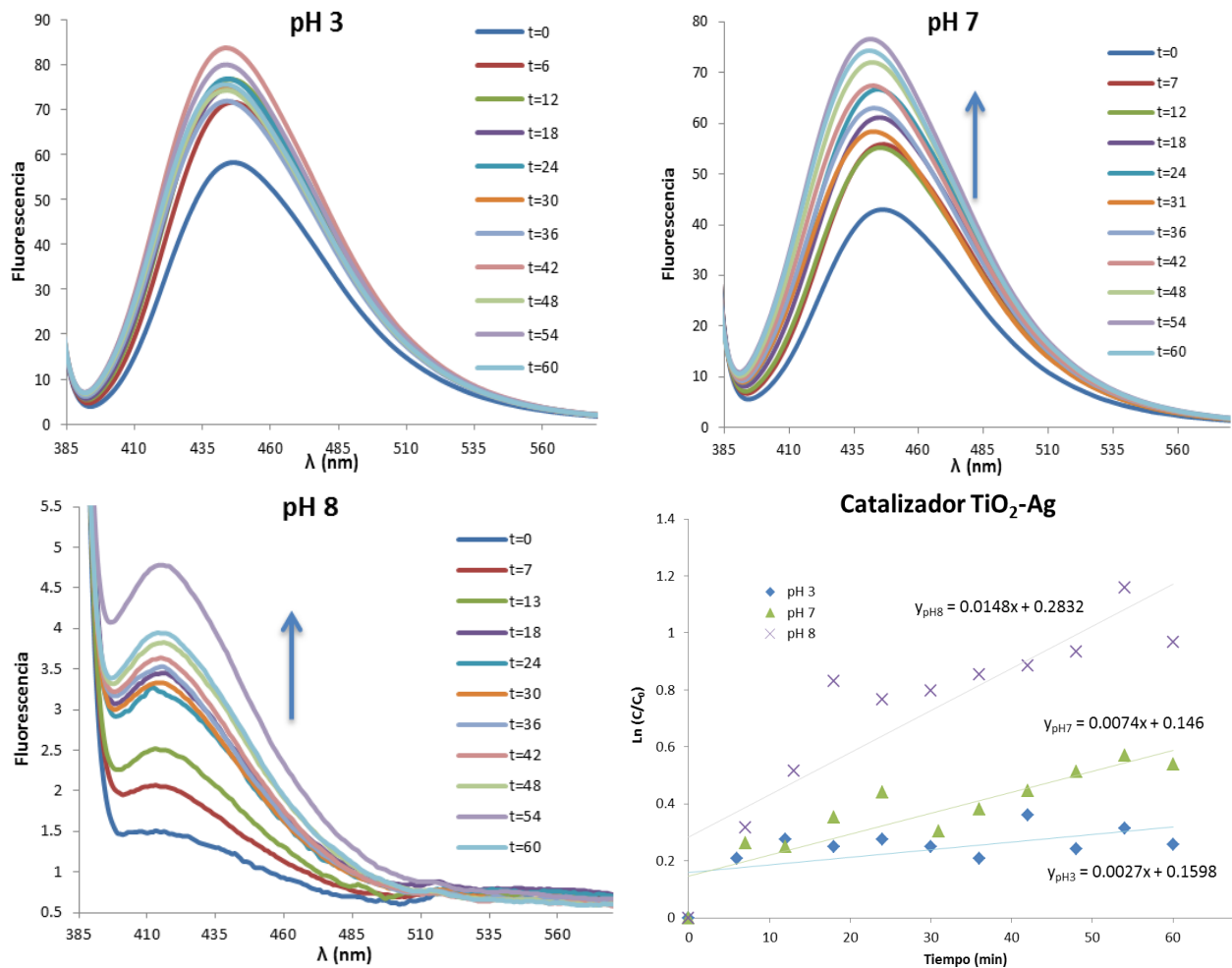


Fig. 6.29: Espectros de fluorescencia de la degradación de ciprofloxacino a pH 3, 7 y 8 con TiO_2-Ag como catalizador expuesta a luz visible y su cinética de primer orden.



Recapitulando el efecto del catalizador en la degradación de Cipro bajo luz visible (Tabla 6.6), se tiene que la mejor degradación a pH 8 con catalizador TiO_2 (se toma en cuenta sin refrigeración porque los otros dos experimentos se llevaron a cabo con esa condición). Las constantes de velocidad más altas se tienen con el catalizador TiO_2 bajo luz visible. Otra vez se percibe que a pH 8 se tienen los valores de constantes de velocidad, k , más altos, incluso cuando no está presente el catalizador.

Tabla 6.6: Valores de la constante cinética de primer orden (min^{-1}) para la degradación de Cipro bajo luz Visible a pH 3, 7 y 8 con catalizador $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ y TiO_2 (sin refrigeración)

	<i>pH 3</i>	<i>pH 7</i>	<i>pH 8</i>
$\text{TiO}_2\text{-Ag}$	0.0027	0.0074	0.0148
TiO_2	0.0074	0.0121	0.0264

En general, la segunda parte de este trabajo sobre la degradación de ciprofloxacino, se resume en la Tabla 6.7; donde la radiación UV resultó ser mejor que luz visible para el catalizador $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ (excepto para pH 3), mientras que para el catalizador TiO_2 la mayor velocidad de oxidación se da cuando está bajo luz visible. Tanto la radiación UV como Visible, así como cualquiera de los dos catalizadores o sin catalizador, funcionan de la misma manera a pH 8, mostrando que a este pH se tienen las pendientes más grandes de todos los experimentos realizados.

Tabla 6.7: Valores de la constante cinética de primer orden (min^{-1}) para la degradación de Cipro bajo UV y luz visible a pH 3, 7 y 8 con ambos catalizadores.

	UV		Visible	
	$\text{TiO}_2\text{-Ag}$	TiO_2	$\text{TiO}_2\text{-Ag}$	TiO_2
pH 3	0.0011	0.0036	0.0027	0.0074
pH 7	0.0147	-0.0028	0.0074	0.0121
pH 8	0.0409	0.0076	0.0148	0.0264



Durante la oxidación de Cipro por TiO_2 y $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ como catalizador en presencia de luz UV o luz visible, se observó que la velocidad de degradación bajo luz visible fue casi similar bajo luz UV a pH bajos; sin embargo, a pH altos, las NPs de $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ son más adecuadas para la oxidación debido al efecto superficial de Plasmón de Ag que inyecta al electrón en la banda de conducción de TiO_2 , reduciendo el efecto de pH. Por el contrario, para TiO_2 , la degradación es adecuada sólo a pH bajo ya que requiere generar carga positiva en la superficie de TiO_2 para interaccionar con el medio disolvente para producir radicales OH. Teóricamente, bajo luz visible esperábamos que $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ pudiera tener una mejor tasa de oxidación para la degradación de Cipro debido a la reducción de la brecha de banda debido al dopaje de Ag sobre TiO_2 que exhibe el efecto superficial de Plasmón en la región visible; sin embargo, los resultados son inconsistentes ya que existe una posibilidad de evaporación lenta y también de adsorción de Cipro sobre el catalizador que influye en la velocidad de oxidación. Por lo tanto, tenemos que volver a analizar la tasa de oxidación de Cipro en diferentes condiciones.

6.4.3 Análisis productos de degradación de ciprofloxacino por HPLC de la oxidación del ciprofloxacino

Se realizó análisis por HPLC (Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución), para comprobar la degradación de Cipro, así como el efecto de pH. Los cromatogramas obtenidos se muestran en la Fig. 6.30. Para el Cipro no degradado (Fig. 6.30a) se observa que el Cipro como tal tiene un tiempo de retención de 2.40 min aproximadamente, al tiempo 3.25 min se plantea que es excipiente (almidón) y al minuto 2.00 puede ser producto levemente oxidado. Para Cipro degradado a pH 3 (Fig. 6.30b) se observa una pequeña lectura al minuto 2.50 lo que nos referiría que es el remanente de Cipro degradado; en los tiempos de retención 3.75 y 5.75 aproximadamente se esperaría que fueran los productos protonados, especialmente al minuto 3.75 donde se presenta el producto protonado prominente. En el cromatograma de Cipro degradado a pH 7 (Fig. 6.30c) se aprecia al Cipro degradado con un tiempo de retención de 2.50 con muy poca intensidad del pico, al minuto 2.00 encontramos al



producto oxidado prominente con el pico de mayor intensidad, al minuto 3.00 se encuentra otro pico que es posible producto oxidado y al minuto 3.25 el excipiente ligeramente oxidado. El cromatograma de Cipro degradado a pH 8 no se reporta debido a que la columna se venció, por lo que se recomienda un futuro intento para los tres pH's a diferentes condiciones con el fin de poder realizar un análisis comparativo eficiente.

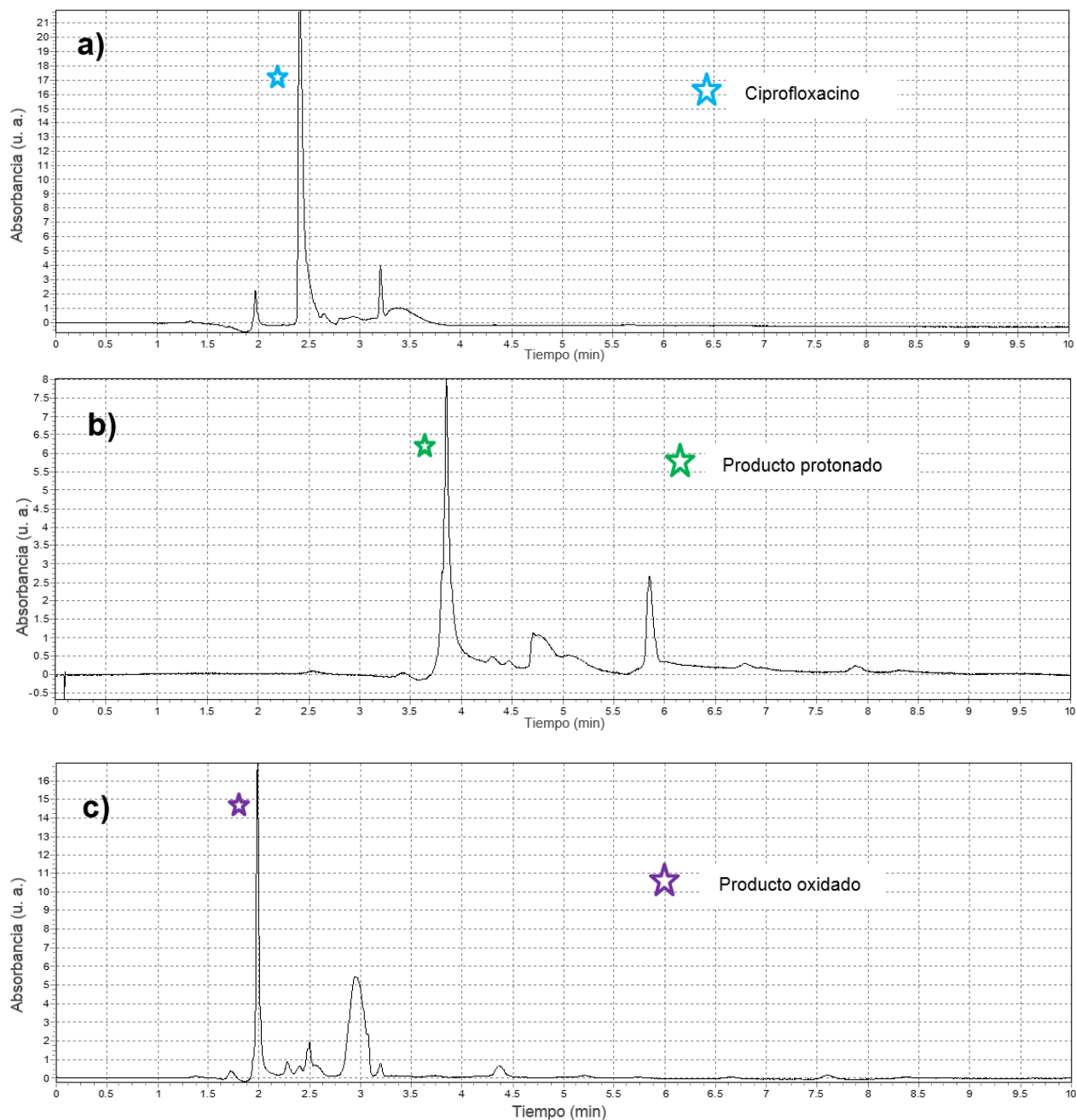


Fig. 6.30: Cromatogramas HPLC de la degradación de Cipro con $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ bajo luz visible después de 5 horas para **a)** Cipro no degradado, **b)** pH 3 y **c)** pH 7.



6.4.4 Mecanismo de degradación de ciprofloxacino

En la Fig. 6.31 se proponen las diferentes estructuras de los productos de degradación por los que se ven afectadas las intensidades de fluorescencia en la degradación de ciprofloxacino.

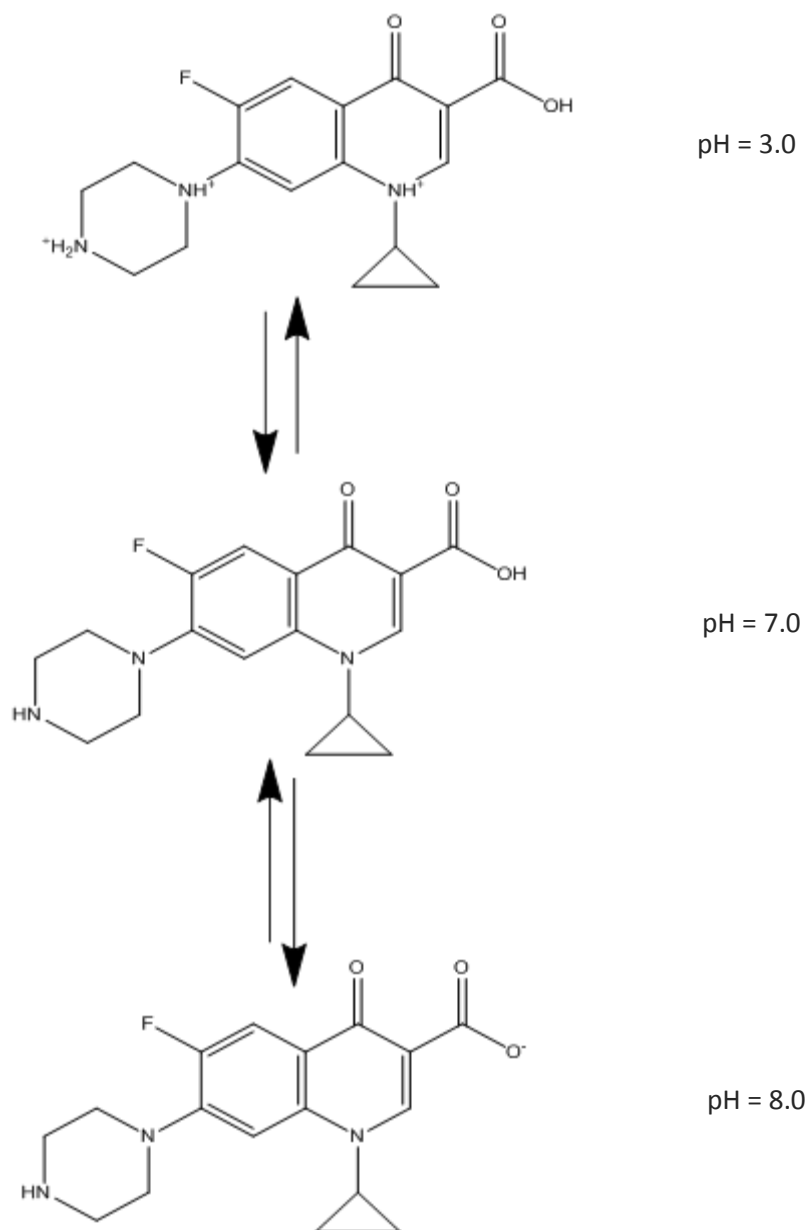


Fig. 6.31: Productos intermedarios de la degradación de Cipro a pH 3, 7 y 8.



El pH afectará la adsorción de los fármacos sobre la superficie de TiO_2 dependiendo de su estructura química. An et al. (2010) [38] investigaron que la dependencia de pH de la fotodegradación de ciprofloxacino asistida por TiO_2 y encontraron que el proceso fotocatalítico era más eficiente a $\text{pH} = 9$ ($k = 0.38 \text{ min}^{-1}$), mientras que más condiciones extremas de pH afectaron significativamente las velocidades de reacción ($k = 0.06 \text{ min}^{-1}$ y 0.07 min^{-1} a $\text{pH} = 3$ y 11 , respectivamente). Esto se debe a la estructura química de ciprofloxacino: a pH alto, tanto el nitrógeno básico en el medio del anillo piperazinilo ($\text{pK}_a = 8.6$) y el grupo carboxílico ($\text{pK}_a = 6.1$) se desprotonan con una carga global negativa. Por lo tanto, la molécula es repelida por la carga superficial negativa del TiO_2 y se produce una mínima adsorción. Similarmente, a pH bajo, ambos grupos funcionales son protonados, y mejorados, la carga positiva global del ciprofloxacino repele la superficie cargada positivamente del fotocatalizador.

La degradación de Cipro fue analizada a diferentes pHs (3, 7 y 8) en solución acuosa bajo luz UV y luz visible en presencia de TiO_2 y $\text{TiO}_2\text{-Ag}$, arrojando un gráfico lineal para $\text{Ln} [C]$ vs. tiempo. Las cinéticas del proceso de degradación fueron determinadas por la medición de la intensidad de fluorescencia de Cipro a diferentes tiempos. Los resultados muestran que la degradación sigue un orden cinético de primer orden, encontrando que la velocidad de remoción más alta fue a pH 8 ($k = 0.0076 \text{ min}^{-1}$ en TiO_2/UV ; $k = 0.0264 \text{ min}^{-1}$ en $\text{TiO}_2/\text{visible}$; $k = 0.0409 \text{ min}^{-1}$ en $\text{TiO}_2\text{-Ag}/\text{UV}$; $k = 0.0148 \text{ min}^{-1}$ en $\text{TiO}_2\text{-Ag}/\text{visible}$). A pH bajo (pH 3), la velocidad de reacción fue disminuida considerablemente ($k = 0.0036 \text{ min}^{-1}$ en TiO_2/UV ; $k = 0.0074 \text{ min}^{-1}$ en $\text{TiO}_2/\text{visible}$; $k = 0.0011 \text{ min}^{-1}$ en $\text{TiO}_2\text{-Ag}/\text{UV}$; $k = 0.0027 \text{ min}^{-1}$ en $\text{TiO}_2\text{-Ag}/\text{visible}$).

La velocidad de degradación para cada una de las reacciones fotolíticas y fotocatalíticas es mayor a pH 8, la cual es aproximadamente en promedio 10 veces más grande que la constante de reacción observada a pH 3 bajo la degradación fotolítica. Esto puede deberse a la velocidad de adsorción de las diferentes especies de ciprofloxacino bajo radiación UV y visible. Curiosamente, la mayor velocidad de



degradación de ciprofloxacino bajo luz visible fue alcanzada solamente cuando se utilizó TiO_2 como catalizador.

Teóricamente, las NPs depositadas de Ag sobre la superficie de TiO_2 pueden efectivamente inyectar electrones a la banda de conducción para crear estados adicionales para los materiales dopados, conduciendo a la formación de hetero-unión, y esto forma efectivamente los radicales OH^\bullet desde la superficie de los catalizadores, además de aumentar la vida media de la excitación del par (e-/h+) y como resultado, observar un incremento en la velocidad de reacción [191].



CAPÍTULO 7



7. CONCLUSIONES

En la primera parte de este trabajo, el antibiótico ciprofloxacino (Cipro) es utilizado como quimio-sensor para la detección simultánea de Al^{3+} y Cu^{2+} por puertas lógicas asistidas por fluorescencia. Con Cipro, Cu^{2+} actúa como desactivador de fluorescencia, mientras que para el Al^{3+} , actúa como activador de fluorescencia. Sin embargo, con una adición secuencial de Cu^{2+} a Cipro, seguido por Al^{3+} , se convierte en puerta lógica apoyado en el modo de fluorescencia activada, el cual también fue probado en la muestra real como células vivas, encontrando que Cipro actúa eficientemente como sonda fluorescente para ion Al^{3+} en sistemas vivos, especialmente en *Saccharomyces cerevisiae*; esto es confirmado por microscopía confocal láser de barrido. De igual manera, como aplicación adicional, la concentración de Cipro también puede determinarse mediante la técnica de fluorescencia añadiendo Al^{3+} o Cu^{2+} .

Para la segunda parte, la actividad fotocatalítica de las NPs de TiO_2 y TiO_2 -Ag bajo luz visible o UV fue probada a diferentes pH's para la oxidación del ciprofloxacino. La velocidad de oxidación del ciprofloxacino sigue una cinética de primer orden en el sustrato. El análisis de la cinética arroja que las NPs de TiO_2 -Ag exhiben una buena foto-oxidación UV y que las NPs de TiO_2 presenta una mayor velocidad de degradación bajo luz visible (se recomienda una investigación más a fondo sobre el efecto de la temperatura de la lámpara visible y la concentración de Cipro en las mediciones de fluorescencia, así como otras condiciones para la columna en HPLC). Los efectos del pH fueron también analizados y resultó que conforme el pH aumenta, lo hace también la constante cinética. Curiosamente, tanto la radiación UV como visible, así como cualquiera de los dos catalizadores, funcionan de la misma manera a pH 8, mostrando que a este pH se tienen las pendientes más grandes de todos los experimentos realizados y por ende las mayores constantes de velocidad de degradación.



REFERENCIAS

1. Kummerer K, Al-Ahmad A, Mersch-Sundermann V (2000) Biodegradability of some antibiotics, elimination of the genotoxicity and affection of wastewater bacteria in a simple test. *Chemosphere* 40: 701-710.
2. Golet EM, Xifra I, Siegrist H, Alder AC, Giger W (2003) Environmental exposure assessment of fluoroquinolone antibacterial agents from sewage to soil. *Environmental Science & Technology* 37: 3243-3249.
3. Watkinson AJ, Murby EJ, Costanzo SD (2007) Removal of antibiotics in conventional and advanced wastewater treatment: Implications for environmental discharge and wastewater recycling. *Water Research* 41: 4164-4176.
4. Le-Minh N, Khan SJ, Drewes JE, Stuetz RM (2010) Fate of antibiotics during municipal water recycling treatment processes. *Water Research* 44: 4295-4323.
5. Leung HW, Minh TB, Murphy MB, Lam JCW, So MK, Martin M, Lam PKS, Richardson BJ (2012) Distribution, fate and risk assessment of antibiotics in sewage treatment plants in Hong Kong, South China. *Environment International* 42: 1-9.
6. Duong HA, Pham NH, Nguyen HT, Hoang TT, Pham HV, Pham VC, Berg M, Giger W, Alder AC (2008) Occurrence, fate and antibiotic resistance of fluoroquinolone antibacterials in hospital wastewaters in Hanoi, Vietnam. *Chemosphere* 72: 968-973.
7. Golet EM, Alder AC, Giger W (2002) Environmental exposure and risk assessment of fluoroquinolone antibacterial agents in wastewater and river water of the Glatt Valley Watershed, Switzerland. *Environmental Science & Technology* 36: 3645-3651.
8. Mitani K, Kataoka H (2006) Determination of fluoroquinolones in environmental waters by in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 562: 16-22.
9. Deegan AM, Cullen M, Oelgemoller M, Nolan K, Tobin J, Morrissey A (2011) A SPE-LC-MS/MS method for the detection of low concentrations of pharmaceuticals in industrial waste streams. *Analytical Letters* 44: 2808-2820.
10. Desnottes JF, Diallo N (1992) Cellular uptake and intracellular bactericidal activity of RP 59500 in murine macrophages. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 30: 107-115.



-
11. Pruden A, Larsson DGJ, Amezcua A, Collignon P, Brandt KK, Graham DW, Lazorchak JM, Suzuki S, Silley P, Snape JR, Topp E, Zhang T, Zhu YG (2013) Management Options for Reducing the Release of Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes to the Environment. *Environmental Health Perspectives* 121: 878-885.
 12. Kang FX, Wang Q, Shou WJ, Collins CD, Gao YZ (2017) Alkali-earth metal bridges formed in biofilm matrices regulate the uptake of fluoroquinolone antibiotics and protect against bacterial apoptosis. *Environmental Pollution* 220: 112-123.
 13. Lloret L, Eibes G, Lu-Chau TA, Moreira MT, Feijoo G, Lema JM (2010) Laccase-catalyzed degradation of anti-inflammatories and estrogens. *Biochemical Engineering Journal* 51: 124-131.
 14. Larsson DGJ, de Pedro C, Paxeus N (2007) Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. *Journal of Hazardous Materials* 148: 751-755.
 15. Tong L, Li P, Wang YX, Zhu KZ (2009) Analysis of veterinary antibiotic residues in swine wastewater and environmental water samples using optimized SPE-LC/MS/MS. *Chemosphere* 74: 1090-1097.
 16. Diwan V, Tamhankar AJ, Khandal RK, Sen S, Aggarwal M, Marothi Y, Iyer RV, Sundblad-Tonderski K, Stalsby-Lundborg C (2010) Antibiotics and antibiotic-resistant bacteria in waters associated with a hospital in Ujjain, India. *Bmc Public Health* 10.
 17. Zhu X, Tsang DCW, Chen F, Li SY, Yang X (2015) Ciprofloxacin adsorption on graphene and granular activated carbon: kinetics, isotherms, and effects of solution chemistry. *Environmental Technology* 36: 3094-3102.
 18. Fabbrizzi L, Licchelli M, Pallavicini P (1999) Transition metals as switches. *Accounts of Chemical Research* 32: 846-853.
 19. Czarnik AW (1994) Chemical communication in water using fluorescent chemosensors. *Accounts of Chemical Research* 27: 302-308.
 20. Raymo FM (2002) Digital processing and communication with molecular switches. *Advanced Materials* 14: 401-+.
 21. Raymo FM, Giordani S (2001) Signal processing at the molecular level. *Journal of the American Chemical Society* 123: 4651-4652.
 22. Raymo FM, Giordani S (2002) Multichannel digital transmission in an optical network of communicating molecules. *Journal of the American Chemical Society* 124: 2004-2007.



-
23. Balzani V, Credi A, Raymo FM, Stoddart JF (2000) Artificial molecular machines. *Angewandte Chemie-International Edition* 39: 3349-3391.
 24. Gupta VK, Jain AK, Shoorra SK (2015) New "on-off" optical probe based on Schiff base responding to Al³⁺ ions: Logic gate application. *Sensors and Actuators B-Chemical* 219: 218-231.
 25. Meng Q, Zhang R, Jia H, Gao X, Wang C, Shi Y, Everest-Dass AV, Zhang Z (2015) A reversible fluorescence chemosensor for sequentially quantitative monitoring copper and sulfide in living cells. *Talanta* 143: 294-301.
 26. Roy N, Dutta A, Mondal P, Paul PC, Singh TS (2015) A new turn-on fluorescent chemosensor based on sensitive Schiff base for Mn²⁺ ion. *Journal of Luminescence* 165: 167-173.
 27. Bencini A, Lippolis V (2012) Probing biologically and environmentally important metal ions with fluorescent chemosensors: Thermodynamic versus optical response selectivity in some study cases. *Coordination Chemistry Reviews* 256: 149-169.
 28. Liao Z-C, Yang Z-Y, Li Y, Wang B-D, Zhou Q-X (2013) A simple structure fluorescent chemosensor for high selectivity and sensitivity of aluminum ions. *Dyes and Pigments* 97: 124-128.
 29. Liu Y-W, Chen C-H, Wu A-T (2012) A turn-on and reversible fluorescence sensor for Al³⁺ ion. *Analyst* 137: 5201-5203.
 30. Liu C-j, Yang Z-y, Fan L, Jin X-l, An J-m, Cheng X-y, Wang B-d (2015) Novel optical selective chromone Schiff base chemosensor for Al³⁺ ion. *Journal of Luminescence* 158: 172-175.
 31. Crapper DR, Krishnan SS, Dalton AJ (1973) Brain aluminum distribution in alzheimers disease and experimental neurofibrillary degeneration. *Science* 180: 511-513.
 32. Nayak P (2002) Aluminum: Impacts and disease. *Environmental Research* 89: 101-115.
 33. Walton JR (2007) An aluminum-based rat model for Alzheimer's disease exhibits oxidative damage, inhibition of PP2A activity, hyperphosphorylated tau, and granulovacuolar degeneration. *Journal of Inorganic Biochemistry* 101: 1275-1284.
 34. House E, Collingwood J, Khan A, Korchazkina O, Berthon G, Exley C (2004) Aluminium, iron, zinc and copper influence the in vitro formation of amyloid fibrils of A beta(42) in a manner



which may have consequences for metal chelation therapy in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimers Disease* 6: 291-301.

35. Exley C, Swarbrick L, Gherardi RK, Authier F-J (2009) A role for the body burden of aluminium in vaccine-associated macrophagic myofasciitis and chronic fatigue syndrome. *Medical Hypotheses* 72: 135-139.

36. Wang ZW, Saxena SK, Pischedda V, Liermann HP, Zha CS (2001) X-ray diffraction study on pressure-induced phase transformations in nanocrystalline anatase/rutile (TiO₂). *Journal of Physics-Condensed Matter* 13: 8317-8323.

37. Sayed M, Ismail M, Khan S, Tabassum S, Khan HM (2016) Degradation of ciprofloxacin in water by advanced oxidation process: kinetics study, influencing parameters and degradation pathways. *Environmental Technology* 37: 590-602.

38. An T, Yang H, Li G, Song W, Cooper WJ, Nie X (2010) Kinetics and mechanism of advanced oxidation processes (AOPs) in degradation of ciprofloxacin in water. *Applied Catalysis B-Environmental* 94: 288-294.

39. Siminiceanu I, Bobu M-M (2006) A comparative kinetic study of the ciprofloxacin degradation in water by several advanced oxidation processes. *Revista De Chimie* 57: 1205-1209.

40. Akpan UG, Hameed BH (2009) Parameters affecting the photocatalytic degradation of dyes using TiO₂-based photocatalysts: A review. *Journal of Hazardous Materials* 170: 520-529.

41. Chen CC, Ma WH, Zhao JC (2010) Semiconductor-mediated photodegradation of pollutants under visible-light irradiation. *Chemical Society Reviews* 39: 4206-4219.

42. Rao KVK, Naidu SVN, Iyengar L (1970) Thermal expansion of rutile and anatase. *Journal of the American Ceramic Society* 53: 124-&.

43. Rothenberger G, Moser J, Gratzel M, Serpone N, Sharma DK (1985) Charge carrier trapping and recombination dynamics in small semiconductor particles. *Journal of the American Chemical Society* 107: 8054-8059.

44. Yin WJ, Chen SY, Yang JH, Gong XG, Yan YF, Wei SH (2010) Effective band gap narrowing of anatase TiO₂ by strain along a soft crystal direction. *Applied Physics Letters* 96.

45. Perkowski J, Bzdon S, Bulska A, Jozwiak WK (2006) Decomposition of detergents present in car-wash sewage by titania photo-assisted oxidation. *Polish Journal of Environmental Studies* 15: 457-465.



-
46. Diebold U (2003) The surface science of titanium dioxide. *Surface Science Reports* 48: 53-229.
 47. Zhang H, Zhu H (2012) Preparation of Fe-doped TiO₂ nanoparticles immobilized on polyamide fabric. *Applied Surface Science* 258: 10034-10041.
 48. Binas VD, Sambani K, Maggos T, Katsanaki A, Kiriakidis G (2012) Synthesis and photocatalytic activity of Mn-doped TiO₂ nanostructured powders under UV and visible light. *Applied Catalysis B-Environmental* 113: 79-86.
 49. Tseng YH, Kuo CH (2011) Photocatalytic degradation of dye and NO_x using visible-light-responsive carbon-containing TiO₂. *Catalysis Today* 174: 114-120.
 50. Subramanian V, Wolf EE, Kamat PV (2003) Influence of Metal/Metal Ion Concentration on the Photocatalytic Activity of TiO₂-Au Composite Nanoparticles. *Langmuir* 19: 469-474.
 51. Tian Y, Tatsuma T (2005) Mechanisms and Applications of Plasmon-Induced Charge Separation at TiO₂ Films Loaded with Gold Nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society* 127: 7632-7637.
 52. Amin MT, Alazba AA, Manzoor U (2014) A Review of Removal of Pollutants from Water/Wastewater Using Different Types of Nanomaterials. *Advances in Materials Science and Engineering* 2014: 1-24.
 53. Ong CN (2015) Water reuse, emerging contaminants and public health: state-of-the-art analysis. *International Journal of Water Resources Development* 32: 514-525.
 54. Akcay H, Oguz A, Karapire C (2003) Study of heavy metal pollution and speciation in Buyuk Menderes and Gediz river sediments. *Water Research* 37: 813-822.
 55. Naidu R, Arias Espana VA, Liu Y, Jit J (2016) Emerging contaminants in the environment: Risk-based analysis for better management. *Chemosphere* 154: 350-357.
 56. Akbar H, Rahim H-K, Mirzaagha B, Jafar A, Ebrahim G-K (2015) Determination of heavy metal ions in vegetable samples using a magnetic metal-organic framework nanocomposite sorbent. *Food Additives & Contaminants: Part A* 32: 725-736.
 57. Xu GY, Wang JF, Si GF, Wang MH, Xue X, Wu BX, Zhou SS (2016) novel highly selective chemosensor based on curcumin for detection of Cu²⁺ and its application for bioimaging. *Sensors and Actuators B-Chemical* 230: 684-689.



-
58. Yang CD, Gong DY, Wang XD, Iqbal A, Deng M, Guo YL, Tang XL, Liu WS, Qin WW (2016) A new highly copper-selective fluorescence enhancement chemosensor based on BODIPY excitable with visible light and its imaging in living cells. *Sensors and Actuators B-Chemical* 224: 110-117.
59. Agarwal C, Prasad E (2012) Detection of Cu(II) and NO by 'on-off' aggregation in poly(aryl ether) dendron derivatives. *New Journal of Chemistry* 36: 1859-1865.
60. You GR, Lee JJ, Choi YW, Lee SY, Kim C (2016) Experimental and theoretical studies for sequential detection of copper(II) and cysteine by a colorimetric chemosensor. *Tetrahedron* 72: 875-881.
61. Qin J-c, Yang Z-y (2015) Ratiometric fluorescent probe for Al³⁺ based on coumarin derivative in aqueous media. *Analytical Methods* 7: 2036-2040.
62. Sen B, Mukherjee M, Banerjee S, Pal S, Chattopadhyay P (2015) A rhodamine-based 'turn-on' Al³⁺ ion-selective reporter and the resultant complex as a secondary sensor for F⁻ ion are applicable to living cell staining. *Dalton Transactions* 44: 8708-8717.
63. Xia S, Xiao SY, Hong QQ, Zou JR, Yang S, Zhang MX, Zuo H (2015) A novel sensitive fluorescent turn-on probe for rapid detection of Al³⁺ and bioimaging. *Rsc Advances* 5: 5244-5249.
64. He K, Soares AD, Adejumo H, McDiarmid M, Squibb K, Blaney L (2015) Detection of a wide variety of human and veterinary fluoroquinolone antibiotics in municipal wastewater and wastewater-impacted surface water. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 106: 136-143.
65. Hassani A, Khataee A, Karaca S (2015) Photocatalytic degradation of ciprofloxacin by synthesized TiO₂ nanoparticles on montmorillonite: Effect of operation parameters and artificial neural network modeling. *Journal of Molecular Catalysis a-Chemical* 409: 149-161.
66. Peres MS, Maniero MG, Guimaraes JR (2015) Photocatalytic degradation of ofloxacin and evaluation of the residual antimicrobial activity. *Photochemical & Photobiological Sciences* 14: 556-562.
67. Wang L, Chen GC, Owens G, Zhang JF (2016) Enhanced antibiotic removal by the addition of bamboo charcoal during pig manure composting. *Rsc Advances* 6: 27575-27583.
68. Xie AJ, Chen Y, Luo SP, Tao YW, Jin YS, Li WW (2015) Electrochemical detection of ciprofloxacin based on graphene modified glassy carbon electrode. *Materials Technology* 30: 362-367.



-
69. Yahya MS, Oturan N, El Kacemi K, El Karbane M, Aravindakumar CT, Oturan MA (2014) Oxidative degradation study on antimicrobial agent ciprofloxacin by electro-fenton process: Kinetics and oxidation products. *Chemosphere* 117: 447-454.
70. Bagheri H, Khoshshafar H, Amidi S, Ardakani YH (2016) Fabrication of an electrochemical sensor based on magnetic multi-walled carbon nanotubes for the determination of ciprofloxacin. *Analytical Methods* 8: 3383-3390.
71. Ge L, Na G, Zhang S, Li K, Zhang P, Ren H, Yao Z (2015) New insights into the aquatic photochemistry of fluoroquinolone antibiotics: Direct photodegradation, hydroxyl-radical oxidation, and antibacterial activity changes. *Science of the Total Environment* 527: 12-17.
72. Alcaraz MR, Bortolato SA, Goicoechea HC, Olivieri AC (2015) A new modeling strategy for third-order fast high-performance liquid chromatographic data with fluorescence detection. Quantitation of fluoroquinolones in water samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 407: 1999-2011.
73. Zhou J-A, Tang X-L, Cheng J, Ju Z-H, Yang L-Z, Liu W-S, Chen C-Y, Bai D-C (2012) An 1,3,4-oxadiazole-based OFF-ON fluorescent chemosensor for Zn^{2+} in aqueous solution and imaging application in living cells. *Dalton Transactions* 41: 10626-10632.
74. Zhou C, Song Y, Li Y (2014) A novel highly sensitive and selective fluorescent sensor for imaging mercury(II) in living cells. *Rsc Advances* 4: 33614-33618.
75. Zhao Y, Zhang X-B, Han Z-X, Qiao L, Li C-Y, Jian L-X, Shen G-L, Yu R-Q (2009) Highly sensitive and selective colorimetric and Off-On fluorescent chemosensor for Cu^{2+} in aqueous solution and living cells. *Analytical Chemistry* 81: 7022-7030.
76. Zhang JF, Kim S, Han JH, Lee S-J, Pradhan T, Cao QY, Lee SJ, Kang C, Kim JS (2011) Pyrophosphate-selective fluorescent chemosensor based on 1, 8-Naphthalimide-DPA-Zn(II) complex and its application for cell imaging. *Organic Letters* 13: 5294-5297.
77. Yu C, Chen L, Zhang J, Li J, Liu P, Wang W, Yan B (2011) "Off-On" based fluorescent chemosensor for Cu^{2+} in aqueous media and living cells. *Talanta* 85: 1627-1633.
78. Yang Y, Yin C, Huo F, Zhang Y, Chao J (2014) A ratiometric colorimetric and fluorescent chemosensor for rapid detection hydrogen sulfide and its bioimaging. *Sensors and Actuators B-Chemical* 203: 596-601.
79. An J-m, Yang Z-y, Yan M-h, Li T-r (2013) A novel off-on fluorescence chemosensor for Ca^{2+} based on Rhodamine-coumarin Schiff base derivative. *Journal of Luminescence* 139: 79-83.



-
80. Hariharan PS, Anthony SP (2014) Selective fluorescence sensing of Mg^{2+} ions by Schiff base chemosensor: effect of diamine structural rigidity and solvent. *Rsc Advances* 4: 41565-41571.
81. Hariharan PS, Hari N, Anthony SP (2014) Triphenylamine based new Schiff base ligand: Solvent dependent selective fluorescence sensing of Mg^{2+} and Fe^{3+} ions. *Inorganic Chemistry Communications* 48: 1-4.
82. Qin J-c, Yang Z-y, Fan L, Wang B-d (2015) beta-Hydroxy-alpha-naphthaldehyde 2-(quinolin-8-yl-oxo) acetyl hydrazone as an efficient fluorescent chemosensor for Mg^{2+} . *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 140: 21-26.
83. Guo L, Hong S, Lin X, Xie Z, Chen G (2008) An organically modified sol-gel membrane for detection of lead ion by using 2-hydroxy-1-naphthaldehyde-8-aminoquinoline as fluorescence probe. *Sensors and Actuators B-Chemical* 130: 789-794.
84. Tayade KC, Kuwar AS, Fegade UA, Sharma H, Singh N, Patil UD, Attarde SB (2014) Design and synthesis of a pyridine based chemosensor: highly selective fluorescent probe for Pb^{2+} . *Journal of Fluorescence* 24: 19-26.
85. Wang J, Chu S, Kong F, Luo L, Wang Y, Zou Z (2010) Designing a smart fluorescence chemosensor within the tailored channel of mesoporous material for sensitively monitoring toxic heavy metal ions $Pb(II)$. *Sensors and Actuators B-Chemical* 150: 25-35.
86. Hariharan PS, Anthony SP (2014) Selective turn-on fluorescence for Zn^{2+} and $Zn^{2+} + Cd^{2+}$ metal ions by single Schiff base chemosensor. *Analytica Chimica Acta* 848: 74-79.
87. Jiang X-J, Li M, Lu H-L, Xu L-H, Xu H, Zang S-Q, Tang M-S, Hou H-W, Mak TCW (2014) A highly sensitive C-3-symmetric Schiff-base fluorescent probe for Cd^{2+} . *Inorganic Chemistry* 53: 12665-12667.
88. Kar C, Samanta S, Goswami S, Ramesh A, Das G (2015) A single probe to sense $Al(III)$ colorimetrically and $Cd(II)$ by turn-on fluorescence in physiological conditions and live cells, corroborated by X-ray crystallographic and theoretical studies. *Dalton Transactions* 44: 4123-4132.
89. Gupta VK, Shoora SK, Kumawat LK, Jain AK (2015) A highly selective colorimetric and turn-on fluorescent chemosensor based on 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol for the detection of aluminium(III) ions. *Sensors and Actuators B-Chemical* 209: 15-24.
90. Gupta VK, Singh AK, Kumawat LK (2014) Thiazole Schiff base turn-on fluorescent chemosensor for Al^{3+} ion. *Sensors and Actuators B-Chemical* 195: 98-108.



-
91. Hung P-J, Chir J-L, Ting W, Wu A-T (2015) A selective colorimetric and ratiometric fluorescent chemosensor for detection of Al^{3+} ion. *Journal of Luminescence* 158: 371-375.
92. Jia T-J, Cao W, Zheng X-J, Jin L-P (2013) A turn-on chemosensor based on naphthol-triazole for Al(III) and its application in bioimaging. *Tetrahedron Letters* 54: 3471-3474.
93. Jang YJ, Yeon YH, Yang HY, Noh JY, Hwang IH, Kim C (2013) A colorimetric and fluorescent chemosensor for selective detection of Cr^{3+} and Al^{3+} . *Inorganic Chemistry Communications* 33: 48-51.
94. Yang Y, Xue H, Chen L, Sheng R, Li X, Li K (2013) Colorimetric and highly selective fluorescence "Turn-on" detection of Cr^{3+} by using a simple Schiff base sensor. *Chinese Journal of Chemistry* 31: 377-380.
95. Kao S-L, Wu S-P (2015) A fluorescent turn-on probe for Hg(II) based on an NTe2 chelating motif and its application in living cell imaging. *Sensors and Actuators B-Chemical* 212: 382-388.
96. Kaur K, Chaudhary S, Singh S, Mehta SK (2014) Schiff base fluorescent moiety salicylideneaniline as a dualchannel chemosensor: A $\text{Hg}^{2+}/\text{Cu}^{2+}$ switchable logic gate. *Science of Advanced Materials* 6: 970-978.
97. Ma T-H, Zhang A-J, Dong M, Dong Y-M, Peng Y, Wang Y-W (2010) A simply and highly selective "turn-on" type fluorescent chemosensor for Hg^{2+} based on chiral BINOL-Schiff's base ligand. *Journal of Luminescence* 130: 888-892.
98. Ni J, Li B, Zhang L, Zhao H, Jiang H (2015) A fluorescence turn-on probe based on rhodamine derivative and its functionalized silica material for Hg^{2+} -selective detection. *Sensors and Actuators B-Chemical* 215: 174-180.
99. Shellaiah M, Rajan YC, Balu P, Murugan A (2015) A pyrene based Schiff base probe for selective fluorescence turn-on detection of Hg^{2+} ions with live cell application. *New Journal of Chemistry* 39: 2523-2531.
100. Liu C, Yang Z, Yan M (2012) A highly selective and sensitive fluorescent turn-on chemosensor for Al^{3+} based on a chromone Schiff base. *Journal of Coordination Chemistry* 65: 3845-3850.
101. Park GJ, Na YJ, Jo HY, Lee SA, Kim C (2014) A colorimetric organic chemo-sensor for Co^{2+} in a fully aqueous environment. *Dalton Transactions* 43: 6618-6622.



-
102. Bu J, Duan H, Wang X, Xu T, Meng X, Qin D (2015) New turn-on fluorescence sensors for Co^{2+} based on conjugated carbazole Schiff base. *Research on Chemical Intermediates* 41: 2767-2774.
103. Kavitha R, Stalin T (2015) Naphthalenediols: A new class of novel fluorescent chemosensors for selective sensing of Cu^{2+} and Ni^{2+} in aqueous solution. *Journal of Luminescence* 158: 313-321.
104. Wang L, Ye D, Cao D (2012) A novel coumarin Schiff-base as a Ni(II) ion colorimetric sensor. *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 90: 40-44.
105. Gupta VK, Mergu N, Singh AK (2014) Fluorescent chemosensors for Zn^{2+} ions based on flavonol derivatives. *Sensors and Actuators B-Chemical* 202: 674-682.
106. Gupta VK, Singh AK, Kumawat LK (2014) A turn-on fluorescent chemosensor for Zn^{2+} ions based on antipyrine schiff base. *Sensors and Actuators B-Chemical* 204: 507-514.
107. Hosseini M, Ghafarloo A, Ganjali MR, Faridbod F, Norouzi P, Niasari MS (2014) A turn-on fluorescent sensor for Zn^{2+} based on new Schiff's base derivative in aqueous media. *Sensors and Actuators B-Chemical* 198: 411-415.
108. Hosseini M, Vaezi Z, Ganjali MR, Faridbod F, Abkenar SD, Alizadeh K, Salavati-Niasari M (2010) Fluorescence "turn-on" chemosensor for the selective detection of zinc ion based on Schiff-base derivative. *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 75: 978-982.
109. Hsieh WH, Wan C-F, Liao D-J, Wu A-T (2012) A turn-on Schiff base fluorescence sensor for zinc ion. *Tetrahedron Letters* 53: 5848-5851.
110. Hu J-H, Li J-B, Qi J, Sun Y (2015) Acylhydrazone based fluorescent chemosensor for zinc in aqueous solution with high selectivity and sensitivity. *Sensors and Actuators B-Chemical* 208: 581-587.
111. Lee JJ, Lee SA, Kim H, LeTuyen N, Noh I, Kim C (2015) A highly selective CHEF-type chemosensor for monitoring Zn^{2+} in aqueous solution and living cells. *Rsc Advances* 5: 41905-41913.
112. Ha Y, Murale DP, Yun C, Manjare ST, Kim H, Kwak J, Leea YS, Churchill DG (2015) H^{+} -Assisted fluorescent differentiation of Cu^{+} and Cu^{2+} : effect of Al^{3+} -induced acidity on chemical sensing and generation of two novel and independent logic gating pathways. *Chemical Communications* 51: 6357-6360.



113. Jayabharathi J, Thanikachalam V, Vennila M, Jayamoorthy K (2012) Physico-chemical studies of new luminescent chemosensor for Cu^{2+} . *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 96: 677-683.
114. Kar C, Adhikari MD, Datta BK, Ramesh A, Das G (2013) A CHEF-based biocompatible turn ON ratiometric sensor for sensitive and selective probing of Cu^{2+} . *Sensors and Actuators B-Chemical* 188: 1132-1140.
115. Lin Q, Yang Q, Sun B, Wei T, Zhang Y (2014) A Novel Highly Selective "Turn-On" Fluorescence Sensor for Silver Ions Based on Schiff Base. *Chinese Journal of Chemistry* 32: 1255-1258.
116. Anand T, Sivaraman G, Anandh P, Chellappa D, Govindarajan S (2014) Colorimetric and turn-on fluorescence detection of Ag(I) ion. *Tetrahedron Letters* 55: 671-675.
117. Hariharan PS, Anthony SP (2015) Substitutional group dependent colorimetric/fluorimetric sensing of Mn^{2+} , Fe^{3+} and Zn^{2+} ions by simple Schiff base chemosensor. *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 136: 1658-1665.
118. Guzow K, Milewska M, Wrolewski D, Gieldon A, Wiczak W (2004) 3-(2-(8-quinolinyloxy)benzoxazol-5-yl)alanine derivative - a specific fluorophore for transition and rare-earth metal ion detection. *Tetrahedron* 60: 11889-11894.
119. Hosseini M, Ganjali MR, Veismohammadi B, Riahi S, Norouzi P, Salavati-Niasari M, Abkenar SD (2009) Highly Selective Ratiometric Fluorescent Sensor for La(III) Ion Based on a New Schiff's Base. *Analytical Letters* 42: 1029-1040.
120. Hu Y, Li Q-q, Li H, Guo Q-n, Lu Y-g, Li Z-y (2010) A novel class of Cd(II) , Hg(II) turn-on and Cu(II) , Zn(II) turn-off Schiff base fluorescent probes. *Dalton Transactions* 39: 11344-11352.
121. Liang Z, Liu Z, Gao Y (2007) A selective colorimetric chemosensor based on calixarene framework for lanthanide ions- Dy^{3+} and Er^{3+} . *Tetrahedron Letters* 48: 3587-3590.
122. Xiong JJ, Huang PC, Zhou X, Wu FY (2016) A highly selective and sensitive "turn-on" fluorescent probe of Cu^{2+} by p-dimethylaminobenzamide-based derivative and its bioimaging in living cells. *Sensors and Actuators B-Chemical* 232: 673-679.
123. Wu QQ, Ma L, Xu YX, Cao DX, Guan RF, Liu ZQ, Yu XY (2016) Two coumarin formhydrazide compounds as chemosensors for copper ions. *Inorganic Chemistry Communications* 69: 7-9.



-
124. Roy N, Nath S, Dutta A, Mondal P, Paul PC, Singh TS (2016) A highly efficient and selective coumarin based fluorescent probe for colorimetric detection of Fe^{3+} and fluorescence dual sensing of Zn^{2+} and Cu^{2+} . *Rsc Advances* 6: 63837-63847.
125. Bekhradnia A, Domehri E, Khosravi M (2016) Novel coumarin-based fluorescent probe for selective detection of $\text{Cu}(\text{II})$. *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 152: 18-22.
126. Xiong JJ, Huang PC, Zhang CY, Wu FY (2016) Colorimetric detection of Cu^{2+} in aqueous solution and on the test kit by 4-aminoantipyrine derivatives. *Sensors and Actuators B-Chemical* 226: 30-36.
127. Zhao B, Xu Y, Ma MJ, Kan W, Deng QG (2015) A selective fluorescence probe for copper(II) ion in aqueous solution based on 4-(1,4,5-triphenyl-1H-imidazol-2-yl)aniliny acetates. *Research on Chemical Intermediates* 41: 8031-8040.
128. Ma YW, Leng TH, Lai GQ, Li ZF, Xu XJ, Zou JW, Shen YJ, Wang CY (2016) A highly selective and sensitive probe based on benzo 1,2-b:4,5-b' dithiophene: synthesis, detection for $\text{Cu}(\text{II})$ and self-assembly. *Tetrahedron* 72: 2219-2225.
129. Trigo-Lopez M, Munoz A, Ibeas S, Serna F, Garcia FC, Garcia JM (2016) Colorimetric detection and determination of $\text{Fe}(\text{III})$, $\text{Co}(\text{II})$, $\text{Cu}(\text{II})$ and $\text{Sn}(\text{II})$ in aqueous media by acrylic polymers with pendant terpyridine motifs. *Sensors and Actuators B-Chemical* 226: 118-126.
130. Chen XL, Zeng WF, Yang XD, Lu XW, Qu JQ, Liu RY (2016) Thiourea based conjugated polymer fluorescent chemosensor for Cu^+ and its use for the detection of hydrogen peroxide and glucose. *Chinese Journal of Polymer Science* 34: 324-331.
131. Li G, Tao FR, Liu Q, Wang LP, Wei Z, Zhu F, Chen WX, Sun HY, Zhou YJ (2016) A highly selective and reversible water-soluble polymer based-colorimetric chemosensor for rapid detection of Cu^{2+} in pure aqueous solution. *New Journal of Chemistry* 40: 4513-4518.
132. Mistri S, Paul A, Bhunia A, Manne RK, Santra MK, Puschmann H, Manna SC (2016) A combined experimental and theoretical investigation on the $\text{Cu}(\text{II})$ sensing behavior of a piperazinyl moiety based ligand, and catecholase and biological activities of its $\text{Cu}(\text{II})$ complex in combination with pyridine 2,5-dicarboxylate. *Polyhedron* 104: 63-72.
133. Meng XF, Xu YX, Liu JL, Sun LN, Shi LY (2016) A new fluorescent rhodamine B derivative as an "off-on" chemosensor for Cu^{2+} with high selectivity and sensitivity. *Analytical Methods* 8: 1044-1051.



134. Ghosh K, Tarafdar D, Majumdar A, Daniliuc CG, Samadder A, Khuda-Bukhsh AR (2016) Dipicolylamine coupled rhodamine dyes: new clefs for highly selective naked eye sensing of Cu^{2+} and CN^- ions. *Rsc Advances* 6: 47802-47812.
135. Gupta VK, Mergu N, Kumawat LK (2016) A new multifunctional rhodamine-derived probe for colorimetric sensing of Cu(II) and Al(III) and fluorometric sensing of Fe(III) in aqueous media. *Sensors and Actuators B-Chemical* 223: 101-113.
136. Kumbhar HS, Gadilohar BL, Shankarling GS (2016) A highly selective quinaldine-indole based spiropyran with intramolecular H-bonding for visual detection of Cu(II) ions. *Sensors and Actuators B-Chemical* 222: 35-42.
137. Feng YL, Fang X, Liu C, Wu XM, Xu M, Jiang WJ, Yu JX, Tan YX, Kuang DZ (2016) 3,5-Dichlorosalicylaldehyde-omicron-rhodamine B Hydrazone: Synthesis and highly selective recognition for Cu^{2+} . *Chinese Journal of Inorganic Chemistry* 32: 56-62.
138. Kowser Z, Jin CC, Jiang XK, Rahman S, Georghiou PE, Ni XL, Zeng X, Redshaw C, Yamato T (2016) Fluorescent turn-on sensors based on pyrene-containing Schiff base derivatives for Cu^{2+} recognition: spectroscopic and DFT computational studies. *Tetrahedron* 72: 4575-4581.
139. Hu XX, Zheng XL, Fan XX, Su YT, Zhan XQ, Zheng H (2016) Semicarbazide-based naphthalimide as a highly selective and sensitive colorimetric and "turn-on" fluorescent chemodosimeter for Cu^{2+} . *Sensors and Actuators B-Chemical* 227: 191-197.
140. Wu YS, Li CY, Li YF, Li D, Li Z (2016) Development of a simple pyrene-based ratiometric fluorescent chemosensor for copper ion in living cells. *Sensors and Actuators B-Chemical* 222: 1226-1232.
141. Erdemir S, Tabakci B, Tabakci M (2016) A highly selective fluorescent sensor based on calix 4 arene appended benzothiazole units for Cu^{2+} , S^{2-} and HSO_4^- ions in aqueous solution. *Sensors and Actuators B-Chemical* 228: 109-116.
142. Bao XF, Cao QS, Wu XL, Shu H, Zhou BJ, Geng YL, Zhu J (2016) Design and synthesis of a new selective fluorescent chemical sensor for Cu^{2+} based on a Pyrrole moiety and a Fluorescein conjugate. *Tetrahedron Letters* 57: 942-948.
143. Saleem M, Khang CH, Kim MH, Lee KH (2016) Chromo/Fluorogenic Detection of Co^{2+} , Hg^{2+} and Cu^{2+} by the Simple Schiff Base Sensor. *Journal of Fluorescence* 26: 11-22.
144. Ge JZ, Zou Y, Yan YH, Lin S, Zhao XF, Cao QY (2016) A new ferrocene-anthracene dyad for dual-signaling sensing of Cu(II) and Hg(II) . *Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry* 315: 67-75.



145. Wang DH, Gong Z, Sun R, Zhao DZ (2015) A turn-on fluorescent chemosensor for selective responses of copper(II) ion pairs. *New Journal of Chemistry* 39: 5991-5996.
146. Ye JH, Xu J, Chen HC, Bai Y, Zhang WC, He WJ (2014) A colorimetric and highly sensitive and selective chemodosimeter for Cu^{2+} and its application in live cell imaging. *Tetrahedron Letters* 55: 6269-6273.
147. Wang D, Zheng JQ, Zheng XJ, Fang DC, Yuan DQ, Jin LP (2016) A fluorescent chemosensor for the sequential detection of copper(II) and histidine and its biological applications. *Sensors and Actuators B-Chemical* 228: 387-394.
148. Jiang Y, Sun L-L, Ren G-Z, Niu X, Hu W-z, Hu Z-Q (2015) A New Fluorescence Turn-On Probe for Aluminum(III) with High Selectivity and Sensitivity, and its Application to Bioimaging. *Chemistryopen* 4: 378-382.
149. Dey S, Halder S, Mukherjee A, Ghosh K, Roy P (2015) Development of highly selective chemosensor for Al^{3+} : Effect of substituent and biological application. *Sensors and Actuators B-Chemical* 215: 196-205.
150. Ye X-P, Sun S-b, Li Y-d, Zhi L-h, Wu W-n, Wang Y (2014) A highly sensitive, single selective, fluorescent sensor for Al^{3+} detection and its application in living cell imaging. *Journal of Luminescence* 155: 180-184.
151. Qin J-c, Li T-r, Wang B-d, Yang Z-y, Fan L (2014) Fluorescent sensor for selective detection of Al^{3+} based on quinoline-coumarin conjugate. *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 133: 38-43.
152. Shoorra SK, Jain AK, Gupta VK (2015) A simple Schiff base based novel optical probe for aluminium (III) ions. *Sensors and Actuators B-Chemical* 216: 86-104.
153. Jeong JW, Rao BA, Son Y-A (2015) Rhodamine-chloronicotinaldehyde-based "OFF-ON" chemosensor for the colorimetric and fluorescent determination of Al^{3+} ions. *Sensors and Actuators B-Chemical* 208: 75-84.
154. Zhou D, Sun C, Chen C, Cui X, Li W (2015) Research of a highly selective fluorescent chemosensor for aluminum(III) ions based on photoinduced electron transfer. *Journal of Molecular Structure* 1079: 315-320.
155. Fan L, Jiang X-h, Wang B-d, Yang Z-y (2014) 4-(8'-Hydroxyquinolin-7'-yl)methyleneimino-l-phenyl-2,3-dimethyl-5-pyazole as a fluorescent chemosensor for aluminum ion in acid aqueous medium. *Sensors and Actuators B-Chemical* 205: 249-254.



-
156. Kim S, Noh JY, Kim KY, Kim JH, Kang HK, Nam S-W, Kim SH, Park S, Kim C, Kim J (2012) Salicylimine-based fluorescent chemosensor for aluminum ions and application to bioimaging. *Inorganic Chemistry* 51: 3597-3602.
157. Ding W-H, Cao W, Zheng X-J, Ding W-J, Qiao J-P, Jin L-P (2014) A tetrazole-based fluorescence "turn-on" sensor for Al(III) and Zn(II) ions and its application in bioimaging. *Dalton Transactions* 43: 6429-6435.
158. Park HM, Oh BN, Kim JH, Qiong W, Hwang IH, Jung K-D, Kim C, Kim J (2011) Fluorescent: chemosensor based-on naphthol-quinoline for selective detection of aluminum ions. *Tetrahedron Letters* 52: 5581-5584.
159. de Silva AP, Vance TP, West MES, Wright GD (2008) Bright molecules with sense, logic, numeracy and utility. *Organic & Biomolecular Chemistry* 6: 2468-2480.
160. Raymo FM, Alvarado RJ, Giordani S, Cejas MA (2003) Memory effects based on intermolecular photoinduced proton transfer. *Journal of the American Chemical Society* 125: 2361-2364.
161. Tian H, Qin B, Yao RX, Zhao XL, Yang SJ (2003) A single photochromic molecular switch with four optical outputs probing four inputs. *Advanced Materials* 15: 2104-+.
162. Wang HM, Zhang DQ, Guo XF, Zhu LY, Shuai ZG, Zhu DB (2004) Tuning the fluorescence of 1-imino nitroxide pyrene with two chemical inputs: mimicking the performance of an "AND" gate. *Chemical Communications*: 670-671.
163. Uchiyama S, McClean GD, Iwai K, de Silva AP (2005) Membrane media create small nanospaces for molecular computation. *Journal of the American Chemical Society* 127: 8920-8921.
164. Liu Y, Jiang W, Zhang H-Y, Li C-J (2006) A multifunctional arithmetical processor model integrated inside a single molecule. *Journal of Physical Chemistry B* 110: 14231-14235.
165. De Silva AP, Gunaratne HQN, McCoy CP (1993) A molecular photoionic and gate based on fluorescent signaling. *Nature* 364: 42-44.
166. Gattas-Asfura KA, Leblanc RM (2003) Peptide-coated CdS quantum dots for the optical detection of copper(II) and silver(I). *Chemical Communications*: 2684-2685.
167. Andersen KE, Fong CY, Pickett WE (2002) Quantum confinement in CdSe nanocrystallites. *Journal of Non-Crystalline Solids* 299: 1105-1110.



-
168. Alivisatos AP (1996) Semiconductor clusters, nanocrystals, and quantum dots. *Science* 271: 933-937.
169. Empedocles SA, Bawendi MG (1997) Quantum-confined stark effect in single CdSe nanocrystallite quantum dots. *Science* 278: 2114-2117.
170. Brus LE (1984) Electron-electron and electron-hole interactions in small semiconductor crystallites - the size dependence of the lowest excited electronic state. *Journal of Chemical Physics* 80: 4403-4409.
171. Hara T, Takemura H, Kanemitsu K, Yamamoto H, Shimada J (2000) Comparative uptake of grepafloxacin and ciprofloxacin by a human monocytic cell line, THP-1. *Journal of Infection and Chemotherapy* 6: 162-167.
172. Nguyen CC, Vu NN, Do T-O (2015) Recent advances in the development of sunlight-driven hollow structure photocatalysts and their applications. *J. Mater. Chem. A* 3: 18345-18359.
173. Jiang Z, Wei W, Mao D, Chen C, Shi Y, Lv X, Xie J (2015) Silver-loaded nitrogen-doped yolk-shell mesoporous TiO₂ hollow microspheres with enhanced visible light photocatalytic activity. *Nanoscale* 7: 784-797.
174. Warren SC, Thimsen E (2012) Plasmonic solar water splitting. *Energy & Environmental Science* 5: 5133-5146.
175. Seh ZW, Liu SH, Low M, Zhang SY, Liu ZL, Mlayah A, Han MY (2012) Janus Au-TiO₂ photocatalysts with strong localization of plasmonic near-fields for efficient visible-light hydrogen generation. *Advanced Materials* 24: 2310-2314.
176. Kamat PV, Flumiani M, Hartland GV (1998) Picosecond dynamics of silver nanoclusters. Photoejection of electrons and fragmentation. *Journal of Physical Chemistry B* 102: 3123-3128.
177. Ozga K, Oyama M, Szota M, Nabialek M, Kityk IV, Slezak A, Umar AA, Nouneh K (2011) Photoinduced absorption of Ag nanoparticles deposited on ITO substrate. *Journal of Alloys and Compounds* 509: S424-S426.
178. Linsebigler AL, Lu GQ, Yates JT (1995) Photocatalysis on TiO₂ surfaces - principles, mechanisms, and selected results. *Chemical Reviews* 95: 735-758.
179. Zhao Y, Lin Z, Liao H, Duan C, Meng Q (2006) A highly selective fluorescent chemosensor for Al(3+) derived from 8-hydroxyquinoline. *Inorganic Chemistry Communications* 9: 966-968.



180. McRae R, Bagchi P, Sumalekshmy S, Fahrni CJ (2009) In situ imaging of metals in cells and tissues. *Chemical Reviews* 109: 4780-4827.
181. Ong HX, Traini D, Bebawy M, Young PM (2013) Ciprofloxacin is actively transported across bronchial lung epithelial cells using a Calu-3 air interface cell model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57: 2535-2540.
182. Yan WF, Chen B, Mahurin SM, Schwartz V, Mullins DR, Lupini AR, Pennycook SJ, Dai S, Overbury SH (2005) Preparation and comparison of supported gold nanocatalysts on anatase, brookite, rutile, and P25 polymorphs of TiO₂ for catalytic oxidation of CO. *Journal of Physical Chemistry B* 109: 10676-10685.
183. Mirkhani V, Tangestaninejad, M., Habibi, M. H. (2008) Photocatalytic degradation of azo dyes catalyzed by Ag-doped TiO₂ photocatalyst. *J. Iran. Chem. Soc.* 6: 578-587.
184. Kondo MM, Jardim WF (1991) Photodegradation of chloroform and urea using ag-loaded titanium diode as catalyst. *Water Research* 25: 823-827.
185. Subramanian V, Wolf EE, Kamat PV (2003) Influence of metal/metal ion concentration on the photocatalytic activity of TiO₂-Au composite nanoparticles. *Langmuir* 19: 469-474.
186. Huerta-Aguilar CA, Pandiyan T, Singh N, Jayanthi N (2015) Three novel input logic gates supported by fluorescence studies: organic nanoparticles (ONPs) as chemo-sensor for detection of Zn(2)(+) and Al(3)(+) in aqueous medium. *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy* 146: 142-150.
187. Chereddy NR, Saranraj K, Barui AK, Patra CR, Rao VJ, Thennarasu S (2014) Donor atom selective coordination of Fe³⁺ and Cr³⁺ trigger fluorophore specific emission in a rhodamine-naphthalimide dyad. *Rsc Advances* 4: 24324-24327.
188. Chereddy NR, Raju MVN, Nagaraju P, Krishnaswamy VR, Korrapati PS, Bangal PR, Rao VJ (2014) A naphthalimide based PET probe with Fe³⁺ selective detection ability: theoretical and experimental study. *Analyst* 139: 6352-6356.
189. Epifani M, Giannini C, Tapfer L, Vasanelli L (2000) Sol-Gel Synthesis and Characterization of Ag and Au Nanoparticles in SiO₂, TiO₂, and ZrO₂ Thin Films. *J. Am. Ceram. Soc.* 83: 2385-2393.
190. Rengaraj S, Venkataraj S, Yeon J-W, Kim Y, Li XZ, Pang GKH (2007) Preparation, characterization and application of Nd-TiO₂ photocatalyst for the reduction of Cr(VI) under UV light illumination. *Appl. Catal. B-Environ.* 77: 157-165.



191. Choi WY, Termin A, Hoffmann MR (1994) The role of metal-ion dopants in quantum-sized TiO_2 - correlation between photoreactivity and charge-carrier recombination dynamics. *Journal of Physical Chemistry* 98: 13669-13679.