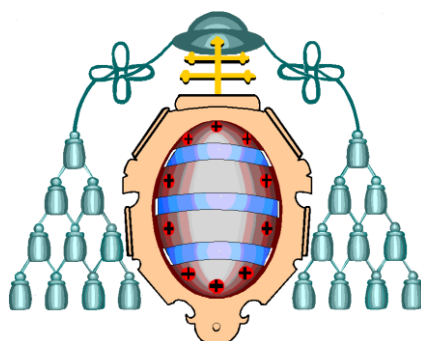


UNIVERSIDAD DE OVIEDO



Departamento de Química Física y Analítica

Programa de Doctorado Análisis químico, bioquímico y estructural  
avanzado (Mención de Calidad)

**SÍNTESIS Y SOLUBILIZACIÓN DE QUANTUM DOTS:  
SU APLICACIÓN AL DESARROLLO DE SENSORES  
QUÍMICOS FOTOLUMINISCENTES**

TESIS DOCTORAL

***ANA MARÍA COTO GARCÍA***

Oviedo, 2012





## RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Síntesis y solubilización de Quantum Dots: su aplicación al desarrollo de sensores químicos fotoluminiscentes.	Inglés: Synthesis and solubilization of Quantum Dots: application to photoluminescent chemical sensors development.
2.- Autor	
Nombre: Ana María Coto García	
Programa de Doctorado: Análisis químico, bioquímico y estructural avanzado	
Órgano responsable: Departamento de Química Física y Analítica	

### RESUMEN (en español)

Los Quantum Dots (QDs) son nanopartículas semiconductoras coloidales que poseen todas sus dimensiones en la escala nanométrica. Estos nanocristales semiconductores presentan una forma aproximadamente esférica (diámetros 1 a 12 nm), están formados por elementos de los grupos II-VI, III-V o IV-VI y poseen entre cientos y miles de átomos rodeados de una capa exterior de moléculas de ligandos. Sus reducidas dimensiones hacen que este tipo de nanomaterial presente unas propiedades optoelectrónicas especiales, de gran interés en el desarrollo de nuevos optosensores químicos y sistemas luminiscentes de análisis. Para obtener este tipo de nanopartículas con una calidad adecuada habitualmente se recurre a la síntesis coloidal a elevadas temperaturas, la cual permite un mejor control sobre el tamaño final de las nanopartículas sintetizadas. Sin embargo, este tipo de procedimientos proporcionan QDs dispersos en medio orgánico (hidrófobos), por lo que un paso previo al empleo de los QDs en cualquier aplicación bioanalítica precisa hacer solubles estas nanopartículas en medio acuoso.

En este contexto, la presente Tesis Doctoral se centró en la síntesis, modificación superficial e inmovilización, caracterización y evaluación de las propiedades de los Quantum Dots de CdSe y CdSe/ZnS para su aplicación como indicadores luminiscentes en el desarrollo de sensores ópticos.

En primer lugar se procedió a la síntesis de QDs de CdSe y CdSe/ZnS para posteriormente evaluar comparativamente dos métodos de modificación superficial (intercambio de ligando y encapsulación dentro de un polímero anfifílico). Se estudiaron comparativamente estas dos vías de solubilización empleando distintas muestras de QDs solubilizadas en medio acuosos, y registrándose los datos relativos a la estabilidad de la señal fotoluminiscente en distintos medios y a diferentes pHs. Adicionalmente se empleó la técnica de AFFF (Asymetrical Flow Field Flow Fractionation) como herramienta complementaria para la caracterización del tamaño hidrodinámico de los quantum dots ya modificados para ser solubles en medio acuoso.

Por otro lado, diversos investigadores han observado un incremento progresivo en la intensidad de emisión luminiscente procedente de los QDs cuando estos están sometidos a un proceso de irradiación continua. A este fenómeno se lo conoce habitualmente como fotoactivación. Por tanto, para profundizar en la caracterización de los QDs se diseñó un ensayo para evaluar la influencia del proceso de fotoactivación sobre QDs dispersos en distintos medios y con distintas modificaciones superficiales. De este modo se llevaron a cabo distintos ensayos para tratar de elucidar el principal mecanismo implicado en el proceso.

Posteriormente, la Tesis Doctoral se orientó hacia la búsqueda de un soporte sólido para la inmovilización de los QDs como indicadores luminiscente en el desarrollo de nuevas fases sensoras. La principal dificultad de esta tarea radica en la necesidad de mantener las propiedades optoelectrónicas de las nanopartículas durante el proceso de inmovilización. Se seleccionó como potencial plataforma para este tipo de desarrollos los soportes inorgánicos tipo "sol-gel". En este contexto, las nanopartículas semiconductoras se incorporaron a la matriz



durante el proceso de síntesis y polimerización de los sol-geles. Se evaluó la viabilidad de los distintos soportes sólidos sintetizados variando distintos parámetros, y seleccionando finalmente el material sol-gel que no modifica sustancialmente las propiedades luminiscentes de las nanopartículas tras el proceso de inmovilización.

Una vez seleccionado el soporte adecuado se procedió a su empleo como plataforma para el desarrollo de fases sensoras basadas en el fenómeno de transferencia de energía o bien de interacción directa con el analito. El empleo de la transferencia de energía en el desarrollo de nuevos métodos luminiscentes se utiliza con el objeto de ampliar el campo de aplicación de los sensores ópticos para el análisis de especies no fotoluminiscentes.

En una primera etapa se seleccionó un indicador sensible al pH como aceptor (los QDs actúan como donadores) co-inmovilizado en el interior de la matriz con las nanopartículas para el desarrollo de un sensor basado en un mecanismo de fluorescencia con transferencia de energía. En una aplicación posterior el material sol-gel dopado únicamente con QDs se empleó como fase sensora luminiscente para el desarrollo de un sensor de vapores orgánicos utilizando herramientas quimiométricas para el control de datos.

Finalmente se profundizó en el empleo de los QDs como donadores en un proceso de fluorescencia con transferencia de energía (FRET). Se evaluó la posibilidad de integrar un aceptor en las proximidades de la superficie del QD con objeto de favorecer el proceso de transferencia de energía. Se persiguió desarrollar una estrategia general para la incorporación de cualquier aceptor dentro de la estructura del polímero anfifílico durante el proceso de recubrimiento/encapsulación de los QDs (donador) para su solubilización en medio acuoso. En este caso se optó por evaluar como especies "modelo" dos aceptores distintos: uno de ellos presentaba variaciones en su espectro de absorbancia en presencia de concentraciones de calcio crecientes en el medio, mientras que el segundo aceptor evaluado modificaba su emisión de fluorescencia por la presencia de calcio.

## RESUMEN (en Inglés)

Quantum Dots (QDs) are colloidal semiconductor nanoparticles whose dimensions are in the nanometric range scale. These semiconductor nanocrystals are roughly spherical (with sizes in the range 1-12 nm) and they are comprised by elements from the periodic groups II-VI, III-V or IV-VI, and are formed by hundreds or thousands atoms surrounded by an external layer of ligands. Their nanometric sizes provide them with exceptional optoelectronic properties, highly useful in the development of new chemical optosensors and luminescence further analytical systems. Colloidal synthesis at high temperature is typically employed in order to obtain high quality nanoparticles, which allow a better control over the final nanoparticles size. However, these methods provide quantum dots dispersed in organic media (hydrophobic), therefore use of the QDs in any bioanalytical applications requires a mandatory nanoparticles water solubilisation step.

Therefore, the general aim of this Thesis was the synthesis, surface modification and immobilization, characterization and optical evaluation of CdSe/ZnS and CdSe QDs prior to their application as luminescence indicators in optical sensors development.

Firstly, synthesis of CdSe and CdSe/ZnS were carried out to evaluate two approaches for nanoparticles surface modification (ligands exchange and adsorption within an amphiphilic polymer). The two solubilisation methods were studied comparatively employing different QDs samples solubilised in aqueous media, recording the relative luminescence intensities from the aqueous in different media and at different pH. Moreover, the AsFFF (Asymmetrical Flow Field Flow Fractionation) technique was employed as a complementary tool to characterize the stability and hydrodynamic size of the QDs modified to be soluble in water media.

On the other hand, several researchers have observed a gradual increase in QDs luminescence intensity emission when they are under continuous irradiation conditions. This phenomena is known as photoactivation. Therefore, to characterize the QDs in depth, an assay was designed to evaluate the influence of photoactivation process on QDs dispersed in different media with



distinct surface modification. Thereby, several assays were performed to clarify the main mechanism involved in this process.

Next a research was aimed at the search of a solid support to immobilize QDs as luminescence indicators in the development of new sensing phases. The main problems to be overcome arise from the need to maintain the advantageous optoelectronic properties of QDs after the immobilization process. As a possible solid support sol-gel matrices were selected. Semiconductor nanoparticles were incorporated inside the solid support matrix during the synthesis and polymerization of sol-gel. The viability of different synthesized solid supports (varying distinct parameters) was evaluated, and finally the material whose optical properties are not significantly modified after the immobilization process was selected. The selected material was employed as platform for the development of sensing phases either based on the energy transfer phenomena or based on the direct interaction with the analyte. The energy transfer was employed in order to extend the application field of optical sensor to analyze non-luminescent species.

In this context, first a pH sensitive dye was selected as acceptor (QDs acts as donors) and co-immobilized in the sol-gel matrix with the nanoparticles to develop a sensor based on fluorescence energy transfer mechanism. In a further stage, sol-gel materials doped only with QDs were employed as fluorescence materials to monitor organic volatile compounds, making use of chemometrics for data treatment.

Finally, it was evaluated the possibility to integrate an analyte-sensitive dye acceptor in close proximity to QD surface (acting as energy donors) with the aim to develop a sensing platform based on fluorescence energy transfer. It was pursued the development a general strategy to incorporate any possible acceptor inside the amphiphilic polymeric shell during the surface modification process of QDs (donors) to solubilise them in aqueous media. In this case, two distinct acceptors were selected and evaluated as a model acceptor: one of them shows variations in their absorbance spectra in contact with different calcium concentrations in the media, whereas the second acceptor evaluated modified their fluorescence emission spectra in presence of calcium.

SR. DIRECTOR DE DEPARTAMENTO DE \_\_\_\_\_ QUÍMICA FÍSICA Y ANALÍTICA \_\_\_\_/  
SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO EN \_\_\_\_\_

## ÍNDICE



INDICE DE FIGURAS.....	VII
INDICE DE TABLAS.....	XIII
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS .....	XV
A. INTRODUCCIÓN.....	1
A.1 Nanociencia y nanotecnología.....	3
A.1.1 Definición.....	5
A.1.2 Impacto Social de la Nanociencia y Nanotecnología.....	7
A.1.3 Nanociencia y Química Analítica.....	10
A.1.4 Tipos de Nanomateriales y Nanoestructuras de Aplicación en Química Analítica.....	12
A.2 Quantum Dots.....	19
A.2.1 Composición.....	22
A.2.2 Comportamiento fotoluminiscente de los QDs: Propiedades y limitaciones.....	24
A.2.3 Técnicas de Caracterización.....	27
A.3 Síntesis y solubilización de los QDs.....	31
A.3.1 Síntesis de Quantum Dots.....	31
A.3.2 Estrategias de solubilización de los quantum dots.....	34
A.3.3 Inmovilización de los Quantum Dots.....	41
A.3.4 Aplicaciones bioanalíticas de los quantum dots.....	43
A.4 Aplicaciones analíticas de los QDs basadas en la medida de sus propiedades luminiscentes: Sensores basados en quantum dots.....	48
A.4.1 Metodologías analíticas basadas en la interacción directa del analito con el QD	48
A.4.2 Reconocimiento molecular basado en inmunoensayos de QD.....	49
A.5 Transferencia de energía por resonancia de fluorescencia.....	53
A.5.1 Fundamento.....	54
A.5.2 Aplicaciones del proceso FRET.....	57
A.5.3 Quantum Dots como fluoróforos en procesos tipo FRET.....	58
A.5.4 Aplicaciones de los QDs en el desarrollo de metodologías bioanalíticas basadas en procesos FRET.....	62
A.6 Bibliografía.....	66
B. OBJETIVOS.....	81
C. EXPERIMENTAL.....	89



C.1	Instrumentación empleada .....	91
C.2	Material y reactivos.....	93
C.2.1	Material empleado en los sistemas de análisis por inyección de flujo.....	93
C.2.2	Material empleado para la síntesis de quantum dots .....	93
C.2.3	Material general.....	93
C.2.4	Reactivos y disoluciones.....	94
C.3	Procedimientos experimentales.....	97
C.3.1	Síntesis de quantum dots.....	97
C.3.2	Síntesis del polímero anfifílico.....	98
C.3.3	Modificación de la superficie de los quantum dots por un proceso de intercambio de ligandos. ....	99
C.3.4	Modificación de la superficie de los quantum dots por interacción con polímero anfifílico. ....	99
C.3.5	Modificación del pH de las disoluciones coloidales de quantum dots...	101
C.3.6	Estimación de la concentración y tamaño de los QDs.....	102
C.3.7	Evaluación del rendimiento cuántico. ....	104
C.3.8	Ensayo fluorimétrico para evaluar la presencia de radicales libres “hidroxilo” en disolución. ....	106
C.3.9	Protocolo de medida de metales libres en disoluciones de quantum dots por ICP-MS.....	107
C.3.10	Síntesis de sol-geles dopados con quantum dots.....	108
C.3.11	Sistemas experimentales.....	110
C.4	Referencias.....	113
D.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	115
D.1	ESTRATEGIAS DE SOLUBILIZACIÓN DE QUANTUM DOTS EN MEDIO ACUOSO: ESTUDIO COMPARATIVO .....	117
D.1.1	Antecedentes y objetivos parciales. ....	117
D.1.2	Tipo de nanopartículas estudiadas. ....	119
D.1.3	Discusión de los resultados.....	120
D.1.4	Referencia .....	145
D.2	FOTOACTIVACIÓN DE LAS DISOLUCIONES COLOIDALES DE QUANTUM DOTS: INFLUENCIA DE LA COMPOSICIÓN Y DEL RECUBRIMIENTO.....	147
D.2.1	Antecedentes y objetivos.....	147

D.2.2	Discusión de los resultados.....	151
D.2.3	Referencias .....	165
D.3	INMOVILIZACIÓN DE QDs EN UN SOPORTE SÓLIDO: DESARROLLO DE FASES SENSORAS LUMINISCENTES.....	169
D.3.1	Antecedentes y objetivos.....	169
D.3.2	Discusión de los resultados.....	175
D.3.3	Referencias .....	198
D.4	ENCAPSULACIÓN DE UN ACEPTOR EN EL RECUBRIMIENTO POLIMÉRICO DE LOS QDs: DESARROLLO DE UN SENSOR DE CALCIO BASADO EN FRET.....	201
D.4.1	Antecedentes y objetivos.....	201
D.4.2	Discusión de resultados.....	205
D.4.3	Referencias .....	223
E.	CONCLUSIONES/CONCLUSIONS.....	227
F.	SUGERENCIAS PARA TRABAJOS FUTUROS.....	233
G.	ANEXO: Relación Publicaciones científicas derivadas del trabajo recogido en la memoria de la Tesis Doctoral .....	239
G.1	Entrapment of Quantum Dots in sol-gel matrices to develop sensing material based on fluorescence resonance energy transfer .....	241
G.2	Asymmetrical flow field-flow fractionation with multi-angle light scattering detection for the analysis of structured nanoparticles.....	253
G.3	Sol-gels doped with polymer-coated ZnS/CdSe quantum dots for the detection of organic vapors.....	263
G.4	Characterization of photoluminescence activation of semiconductor nanoparticles for optical sensors.....	271
G.5	The Influence of surface coating on the properties of water-soluble CdSe and CdSe/ZnS Quantum Dots .....	283
G.6	Nanoparticles as fluorescent labels for optical imaging and sensing in genomics and proteomics .....	319



## INDICE DE FIGURAS

---

Figura 1. Áreas de aplicación actuales de la nanotecnología <sup>8</sup> . .....	4
Figura 2. Disciplinas que engloban la Nanociencia y la nanotecnología. ....	5
Figura 3. Relación entre la Química Analítica y la Nanociencia.....	11
Figura 4. Clasificación de las nanoestructuras en función de sus dimensiones.....	15
Figura 5. Comparación entre el tamaño de los QDs y otros compuestos: FITC (Fluorescein isothiocyanate), CdSe/ZnS (verde: 4 nm diámetro; rojo 6,5 nm diámetro), qrod (QD en forma de barra), SAV (Streptavidina ~ 60 kDa), MBP (Maltose Binding Protein ~ 40 kDa), IgG (inmunoglobulina G ~ 150 kDa). .....	19
Figura 6. Diagramas de niveles de energía en función del número de átomos. A medida que aumenta el número de átomos, los niveles discretos de los orbitales atómicos se convierten en bandas de energía.....	20
Figura 7. Espectro de absorción (A) y emisión fluorescente (B) típicos de QDs de diferente tamaño con núcleo de CdSe y recubrimiento de ZnS.....	22
Figura 8. A) Correlación del máximo de emisión luminiscente con el tamaño de QDs compuestos de diferentes materiales semiconductores <sup>41</sup> . B) Intervalos de emisión fotoluminiscente aproximados de QDs de diferente naturaleza. ....	22
Figura 9. Representación esquemática de la alineación de los niveles de energía de diferentes sistemas core/shell. Los bordes superiores e inferiores de los rectángulos se corresponden con los bordes de las bandas de conducción y valencia del núcleo y el recubrimiento, respectivamente.....	23
Figura 10. Diagrama de niveles de energía que representa la promoción de un electrón desde la banda de valencia a la banda de conducción, generando un hueco ( $h^+$ ). ....	26
Figura 11. Estrategias de solubilización de los QDs en medios acuosos. <sup>71</sup> .....	36
Figura 12. Imágenes de fluorescencia de QDs como marcadores en células cancerosas, en una sección de un tejido e in vivo en un tumor prostático en una rata. ....	46
Figura 13. Aplicaciones de los quantum dots <sup>41</sup> . ....	47
Figura 14. Esquema representativo de un proceso FRET. ....	55
Figura 15. Esquema típico de síntesis de QDs CdSe/ZnS a altas temperaturas.....	97
Figura 16. Representación esquemática del proceso de modificación de QDs por intercambio de ligandos. ....	99
Figura 17. Representación esquemática del proceso de solubilización mediante la incorporación con polímero anfifílico. ....	100

Figura 18. Filtros de membrana (Amicon, Centricon) para la ultracentrifugación.....	102
Figura 19. Aspecto final xerogel poroso dopado con QDs bajo luz natural (A) y bajo irradiación con luz UV (B). .....	109
Figura 20. Esquema del proceso de preparación de un xerogel poroso dopado con QDs (donador) y un colorante sensible al pH (aceptor).....	110
Figura 21. Esquema de las diferentes celdas de fluorescencia utilizadas: (A) 101-QS; (B) 114F-QS; (C) 176.052-QS.....	111
Figura 22. Esquema del sistema FIA utilizado para la caracterización de las fases sensoras sol-gel. ....	112
Figura 23. Esquema del sistema utilizado para el desarrollo de la fase sensora para la detección de compuestos orgánicos volátiles. ....	112
Figura 24. Esquema del diseño experimental empleado como cámara de fotoactivación.....	113
Figura 25. Representación esquemática de las diferentes muestras de QDs empleadas a lo largo del estudio comparativo. ....	122
Figura 26. Espectros de A) absorbancia y B) fluorescencia de distintas muestras de QD con núcleo de CdSe antes y después de ser sometidas al proceso de solubilización.....	123
Figura 27. Efecto del pH sobre la intensidad de luminiscencia de QDs de CdSe (A) y CdSe/ZnS (B) con diferente modificación superficial.....	124
Figura 28. Fotografías de viales de vidrio que contienen suspensiones coloidales de CdSe y CdSe/ZnS QDs en cloroformo iluminadas con luz UV. ....	125
Figura 29. Imágenes de microscopía de transmisión electrónica de QDs coloidales solubles en medio acuoso tomada un mes después de la síntesis. A) QDs-MAA; B) QDs-P.....	126
Figura 30. Imágenes de QDs CdSe/ZnS en medio orgánico (A) de QDs CdSe/ZnS-MAA de pH 12 (B) y de de QDs CdSe/ZnS-P (C) a distintos pHs obtenidas mediante microscopía de fluorescencia. ....	128
Figura 31. Estabilidad de la emisión de luminiscencia de los QDs con diferente modificación superficial frente al tiempo de irradiación a diferentes pHs. ....	129
Figura 32. Imágenes de diferentes disoluciones de QDs de CdSe/ZnS modificados por interacción con polímero (QDs-P), o intercambios de ligandos con ácido mercaptoacético (QDs-MAA) y ácido mercaptoetanosulfónico (QDs-MES). A) imagen de disoluciones de QDs recién sintetizados cuando se iluminan con luz ultravioleta; B) imagen de las disoluciones tras dos semanas desde el proceso de modificación obtenida bajo irradiación UV; C) imagen de las disoluciones de QDs tras dos semanas desde su modificación observada a la luz natural. ....	130

Figura 33. Evolución de la emisión de luminiscencia de QDs CdSe/ZnS-P en medio acuoso a diferentes pHs: medidas efectuadas días después del proceso de modificación y medidas de fluorescencia efectuadas cuatro meses después de la modificación superficial.....	131
Figura 34. A) Esquema representativo del mecanismo general de separación en FFF. B) Representación esquemática del mecanismo de separación en el caso de AF4. ....	137
Figura 35. Espectro de absorbancia y fluorescencia de la muestra de CdSe/ZnS-P coloidales estudiados en medio acuoso a pH=12.....	141
Figura 36. Perfiles de elución obtenidos para la muestra CdSe/ZnS-P mediante UV/Vis a 254 nm (verde), MALS (rojo), RI (azul) y fluorescencia (rosa). La señal de fluorescencia se registró estableciendo como longitud de onda 370 nm y 600 nm como longitud de onda de emisión.....	142
Figura 37. Representación gráfica 3D de la variación de la absorbancia con el tiempo (eje x) y longitud de onda (eje y). Volumen muerto $t = 7$ min. ....	143
Figura 38. Perfiles de la muestra de CdSe/ZnS-P (azul) y el blanco P (negro) en las mismas condiciones experimentales. Se comparan las señales de RI. ....	144
Figura 39. Diagrama esquemático de los QDs con distinto núcleo o modificación superficial utilizados a lo largo del estudio de la fotoactivación. ....	152
Figura 40. Viales de vidrio que contienen dispersiones coloidales de QDs de CdSe y CdSe/ZnS en cloroformo antes y después del proceso de fotoactivación. Fotografía tomada bajo iluminación con luz UV.....	155
Figura 41. Comparación entre las distintas evoluciones de las longitudes de onda del máximo presentadas por QDs de tipo núcleo o núcleo/recubrimiento: a) QDs rodeados de moléculas orgánicas de TOPO en cloroformo; b) QDs-MAA en disolución acuosa; c) QDs-P en disolución acuosa. Se presentan las funciones de ajuste y las barras de error. ....	157
Figura 42. Evolución de los espectros de fluorescencia de los QDs tipo núcleo y núcleo/recubrimiento (QDs-TOPO en cloroformo, QDs-MAA en disolución acuosa y QDs-P en disolución acuosa).....	158
Figura 43. Evolución de la longitud de onda del máximo de emisión de los QDs tipo núcleo y núcleo recubrimiento: a) QDs-TOPO en cloroformo; b) QDs-MAA en disolución acuosa; c) QDs-P en disolución acuosa.....	159
Figura 44. Evolución de la intensidad de luminiscencia y desplazamiento hacia el azul de los QDs de CdSe/ZnS-P en presencia y ausencia de oxígeno disuelto en el medio. ....	160

Figura 45. Medidas de ICP-MS de los iones $Cd^{2+}$ , $Se^{2+}$ , $Zn^{2+}$ liberados de a partir del núcleo de los QDs a medida que se incrementa el tiempo de irradiación. ....	163
Figura 46. Efecto de la irradiación de la luz UV sobre a) emisión de luminiscencia de los QDs-P en suspensión coloidal; b) emisión de luminiscencia del anión 2-hidroxiterephthalato en presencia de QDs-P; c) emisión de luminiscencia de anión 2-hidroxiterephthalato en presencia de polímero libre (el mismo polímero utilizado para la solubilización de los QDs) pero si QDs.....	164
Figura 47. Esquema representativo del proceso sol-gel. ....	172
Figura 48. Espectro de emisión de los QDs de CdSe/ZnS-TOP/TOPO inmovilizados en el soporte sol-gel antes (línea sólida) y después de haber sido expuestos a un flujo de agua (línea de puntos) $\lambda_{ex} = 350 \text{ nm}$ . ....	176
Figura 49. Espectro de emisión de QDs CdSe/ZnS-P en disolución (línea de puntos) e incorporados en el interior de una matriz sol-gel (línea sólida) $\lambda_{ex} = 350 \text{ nm}$ . ....	178
Figura 50. Espectro de emisión de QDs de CdSe/ZnS-P en disolución acuosa (línea de puntos) e incorporados en el soporte sol-gel mediante el empleo de APTES como precursor (línea sólida) $\lambda_{ex} = 350 \text{ nm}$ .....	179
Figura 51. Aspecto final de dos sol-geles dopados con QDs de diferente emisión luminiscente una vez han sido tamizados A) bajo luz natural y B) bajo luz UV. ....	180
Figura 52. Solapamiento espectral entre el espectro de emisión de los QDs y el espectro de absorción de un aceptor (colorante) a dos valores de pH. ....	182
Figura 53. Efecto de variaciones de pH del medio sobre la intensidad de emisión luminiscente procedente de QDs CdSe/ZnS-P atrapados en el interior de la estructura sol-gel.....	183
Figura 54. Esquema del funcionamiento de la fase sensora sol-gel que posee en su interior co-inmovilizados QDs (donador) y BCP (aceptor). ....	183
Figura 55. Efecto de concentraciones crecientes del aceptor (BCP) añadidos a la mezcla de precursores poliméricos sobre la emisión de luminiscencia del sol-gel dopado con QDs resultante. En la parte superior derecha se muestra la variación del espectro de absorbancia para diferentes concentraciones del aceptor. La tabla en la parte inferior derecha recoge los valores de tiempos de vida para sol-geles dopados con distintas cantidades de donador (QDs) y aceptor (BCP). ....	185
Figura 56. Decrecimiento de la emisión de luminiscencia del donador (QDs) a medida que el pH se incrementa. ....	187
Figura 57. Respuesta fluorescente de la fase sensora A a repetidas exposiciones a 6,52 mmoles de etanol.....	192

Figura 58. Respuesta de la fluorescencia del sensor A y el sensor B a 23,2 mmol de (1) etanol, (2) metanol y (3) acetona.....	194
Figura 59. Resultados del análisis por PCA del sensor A y B. Los puntos en el interior de los círculos representan la respuesta dinámica a repetidas exposiciones de los vapores al sensor. (1-3) 23, 26 mmol Etanol, (4-6) 14,34 mmol Etanol, (7-9) 6,52 mmol Etanol; (10-12) 38,12 mmol Metanol, (13-15) 23,43 mmol Metanol, (16-18) 14,34 mmol Metanol; (19-21)38,02 mmol Cloroformo, (22-24) 23,20 mmol Cloroformo, (25-27) 14,32 mmol Cloroformo (28-31) 23,10 mmol Acetona, (32-34) 14,31 mmol Acetona, (35-37) 10,86 mmol Acetona.....	196
Figura 60. Resultados del análisis por PCA de (A) la respuesta del sensor A y (B) de la respuesta del sensor B. Los puntos dentro de cada círculo representan la respuesta dinámica a partir de la exposición del sensor a los vapores. (1-3) 23,26 mmol Etanol, (4-6) 14,34 mmol Etanol, (7-9) 6,52 mmol Etanol; (10-12) 38,12 mmol Metanol, (13-15) 23,43 mmol Metanol, (16-18) 14,34 mmol Metanol; (19-21) 38,02 mmol Cloroformo, (22-24) 23,20 mmol Cloroformo, (25-27) 14,32 mmol Cloroformo (28-31) 23,10 mmol Acetona, (32-34) 14,31 mmol Acetona, (35-37) 10,86 mmol Acetona. ....	197
Figura 61. Esquema del proceso de solubilización y encapsulamiento del aceptor en el recubrimiento polimérico de los QDs.....	206
Figura 62. Variación del espectro de absorbancia de la mezcla de indicadores (ETH 1001 + ETH 5294) en presencia de concentraciones crecientes de calcio en el medio, y solapamiento entre el espectro de absorbancia de la mezcla de aceptores y el espectro de emisión fluorescente de los QDs de CdSe/ZnS.....	209
Figura 63. Respuesta del sistema (QDs-A)-P donde A= ETH 1001 + ETH 5294 ante concentraciones crecientes de calcio en el medio ( $[Ca^{2+}] = 0,2$ y $2,2$ mM). ....	211
Figura 64. Estructura química del A) Calcium Crimson y B) X-Rhod-1.....	212
Figura 65. Respuesta del indicador fluorescente sensible al calcio X-Rhod-1 atrapado en interior del polímero PMA75C12 A) en una disolución reguladora de pH 7,2 de MOPS-KCl y B) en una disolución reguladora de TRIS de pH 7,2 ambas purificadas con resina Chelex.....	216
Figura 66. Solapamiento entre el espectro de excitación del colorante X-Rhod-1 y el espectro de emisión de los QDs de CdSe/ZnS. ....	217
Figura 67. Esquema representativo de la plataforma para el desarrollo del sensor de calcio A) Fluorescencia del sistema QDs-P cuando se excita a la longitud de onda propia de los semiconductores cristalinos. B) Fluorescencia del sistema (QDs-A)-P: cuando el aceptor	



*está integrado en el interior del sistema la emisión de luz por parte de los QDs provoca la excitación y posterior emisión por parte del aceptor si este se encuentra unido a calcio presente en disolución. .... 218*

**Figura 68.** *Respuesta del sistema QDs-A-P (A = X-Rhod-1) una vez purificado con resina Chelex frente a diferentes concentraciones de calcio en el medio. Condiciones:  $\lambda_{exc} = 350\text{ nm}$ , rendijas 20/20 nm y voltaje del PMT 700 V..... 220*

**Figura 69.** *Solapamiento entre el espectro de excitación del indicador fluorescente sensible al calcio (Aceptor) y el espectro de emisión de los QDs comerciales(Donador). .... 221*

**Figura 70.** *Respuesta del sistema (QDs-A)-P donde A = X-Rhod-1 a concentraciones crecientes de calcio en el medio. Condiciones de medida  $\lambda_{ex} = 350\text{ nm}$ ; Rendijas 20/20 nm; Voltaje 650 v ..... 222*

## INDICE DE TABLAS

---

Tabla 1. <i>Lista de reactivos utilizados a lo largo de este trabajo.</i> .....	94
Tabla 2. <i>Rendimientos cuánticos Q estimados de QDs de CdSe/ZnS con diferente modificación superficial y en distintos medios.</i> .....	133
Tabla 3. <i>Parámetros extraídos a partir del ajuste de los datos experimentales del proceso de fotoactivación de los QDs coloidales empleados en el estudio.</i> .....	154
Tabla 4. <i>Efecto de concentraciones crecientes de aceptor (BCP) sobre la luminiscencia del donador (QDs) y sobre la eficiencia de FRET co-inmovilizados en la matriz.</i> .....	186
Tabla 5. <i>Efecto de las variaciones de pH de las muestras sobre las intensidades de luminiscencia y sobre las eficiencias de FRET medidas cuando se emplea como fase sensora una matriz sol-gel sintetizada co-inmovilizando los QDs-P con el aceptor (BCP).</i> .....	188



## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

---

AAS	Espectroscopia de Absorción Atómica
AFM	Microscopía de Fuerza Atómica
APTES	(3-Aminopropil) trietoxisilano
AsFFF	Asymmetric Flow Field Flow Fractionation
BCP	Púrpura de Bromocresol
CV	Voltametría Cíclica
DLS	Dispersión de luz dinámica
ED	Difracción de Electrones
EDC	Hidrocloruro de N-(3-dimetilaminopropil)-N-etil-carbodiimida
EGTA	Ácido etilenglicol-bis( $\beta$ -aminoetil éter)- N, N, N', tetraacético
EPA	Agencia de Protección Medioambiental de EE. UU.
FFF	Field-Flow Fractionation
FRET	Förster/Fluorescence Resonance Energy Transfer
HRTEM	Microscopía de Transmisión Electrónica de alta resolución
ICP-MS	Espectrometría de Masas con fuente de Plasma de Acoplamiento Inductivo
ICP-OES	Espectrometría de Emisión Óptica con fuente de Plasma de Acoplamiento Inductivo
IR	Infrarrojo
LED	Light Emitting Diode
MAA	Ácido mercaptoacético
MALS	Multiangle Light Scattering
MES	Ácido Mercaptoetanosulfónico
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico
MTMOS	Metiltrimetoxisilano
NNI	Iniciativa Nacional sobre Nanotecnología de EE. UU.
NPs	Nanopartículas
OLED	Organic light emitting diodes
PCA	Análisis por Componentes Principales
QDs	Quantum Dots
QY	Rendimiento cuántico
RBS	Rutherford Backscattering

RMN	Resonancia Magnética Nuclear
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
TEM	Microscopía de Transmisión Electrónica
TMOS	Tetrametoxisilano
TOP	Trioctilfosfina
TOPO	Óxido de Trioctilfosfina
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
UV	Ultravioleta
VOCs	Compuestos Orgánicos Volátiles
Z-TEM	Atomic Number Contrast Scanning Transmission Electron Microscopy

## **A. INTRODUCCIÓN**



## A.1 NANOCIENCIA Y NANOTECNOLOGÍA.

La Nanociencia y la Nanotecnología son disciplinas de reciente creación que a lo largo de los últimos años han pasado de estar en manos de unos pocos investigadores a constituir una de las bases de los avances científicos recientes y parece que podrían ser cruciales en los progresos científicos y tecnológicos de los próximos años. De hecho, el término Nanotecnología ha captado el interés general de la sociedad actual, más concretamente de políticos y economistas, cuyo interés por el tema es hoy muy elevado ante el posible impacto futuro de la Nanociencia/Nanotecnología en nuestra sociedad<sup>1</sup>. Algunos autores hablan incluso de la “ciencia del próximo siglo”.

El crecimiento exponencial experimentado en los desarrollos de la Nanotecnología se debe a diversos factores. Entre ellos, hay que destacar los avances científicos y tecnológicos que han surgido durante las dos últimas décadas y que han permitido incrementar la capacidad de manipular la materia a escala nanométrica. Debemos tener en cuenta que el límite dimensional para la Nanotecnología está por debajo de los 100 nm; es decir, se considera que es por debajo de esta dimensión cuando los materiales (nanomateriales) adquieren propiedades diferentes o realzan las que ya poseen. El reciente desarrollo de las técnicas de caracterización y análisis a escala nano ha posibilitado el diseño y fabricación de dispositivos a tamaño nanométrico<sup>2</sup>. Un nanómetro (nm) es una unidad de longitud  $10^{-9}$  m del Sistema Internacional (SI). Al llegar a dicha escala dimensional nos adentramos en el tamaño de átomos o moléculas.

Aparte de los avances en microscopía el vertiginoso avance en la Nanociencia y la Nanotecnología actual se puede explicar considerando, por una parte, el fulminante desarrollo de la industria electrónica y, por otra, la necesidad de buscar nuevos materiales que permitan el desarrollo de una economía más sostenible. Desde luego los avances en los métodos de caracterización, también han contribuido a dichos avances.

Además es obvio que los materiales nanoestructurados son fundamentalmente “*sustancias químicas sintéticas*”, y solo cuando se controla apropiadamente su síntesis es posible avanzar en sus aplicaciones científico-tecnológicas<sup>3</sup>. Es decir, el campo de la síntesis y los avances en esta línea es otro de los aspectos clave que han contribuido al extraordinario progreso científico y tecnológico derivados de la Nanociencia y la Nanotecnología.

En esta línea, un avance clave lo ha constituido el descubrimiento de los nanotubos de carbono por parte del científico japonés Sumio Iijima<sup>4</sup>, descubrimiento



que generó un gran interés debido a sus posibles aplicaciones en ingeniería. A pesar de la consideración actual de estas disciplinas como de “recientes”, el ser humano ha hecho uso de la Nanotecnología de forma involuntaria desde hace siglos<sup>5</sup>. Así se han encontrado nanopartículas de oro y plata en el análisis de algunos pigmentos empleados como colorantes de cristales del siglo X d. C. que son los responsables de las bellas tonalidades de estos vidrios (p. ej. vidrieras en catedrales góticas), ya que en función del tamaño y composición de las nanopartículas empleadas estas pueden presentar emisión de luz roja, azul o dorada.

Los resultados en estas nuevas áreas punteras de investigación nano no son meras promesas (o temas puramente académicos), sino que hoy algunos de los resultados de la investigación en el campo de la Nanociencia ya se han transferido con éxito a la industria, y han propiciado las primeras aplicaciones comerciales<sup>6</sup> en sectores como: electrónica, automoción, material deportivo, cosmética, etc. De hecho fuera del ámbito puramente científico se puede decir que el término “nano” está de moda. La Figura 1 recoge, esquemáticamente, algunas de las áreas científico-tecnológicas que ya hacen uso de materiales o procesos en el ámbito de la nanoescala. Es decir, existen ya productos de comerciales que incorporan algún componente “nano”, aunque, los expertos consideran que la Nanotecnología aún se encuentra en su fase inicial de desarrollo, lejos de los grandes logros que de ella se esperan<sup>7</sup>. Así, continuamente están apareciendo nuevos avances nanotecnológicos con aplicaciones relevantes en campos como: la medicina, seguridad y defensa, producción y almacenamiento de energía, electrónica y comunicaciones<sup>8</sup>.

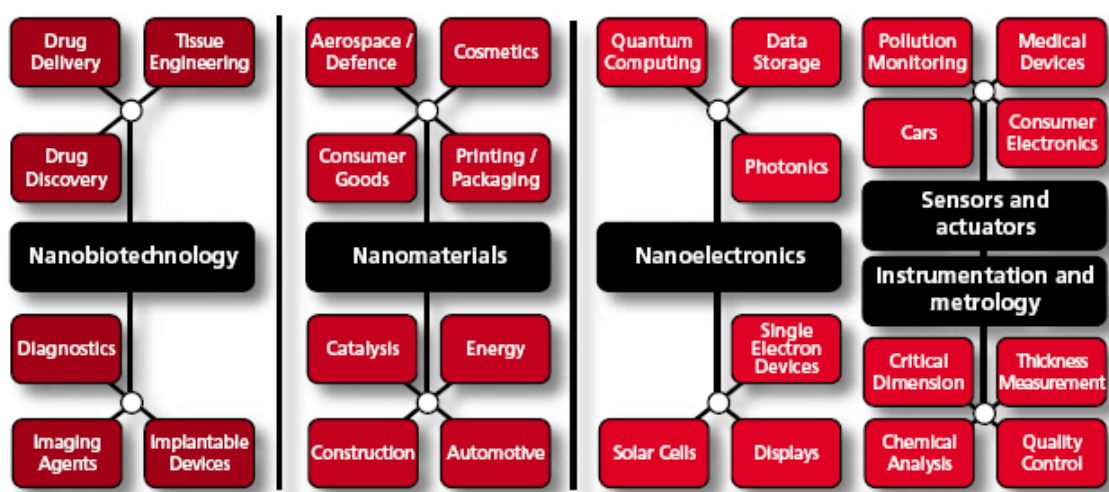
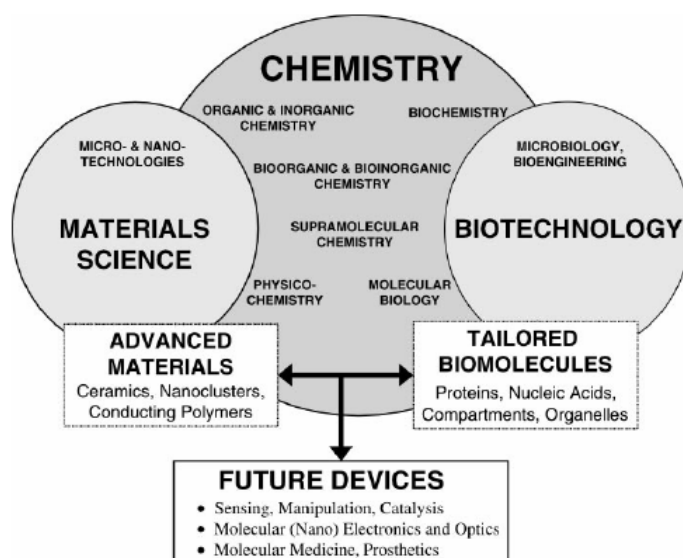


Figura 1. Áreas de aplicación actuales de la nanotecnología<sup>8</sup>.

Todos estos desarrollos han permitido el elevado grado actual de reconocimiento de la Nanociencia y Nanotecnología por parte de la sociedad. Así, en el año 2000 EE. UU. creó un programa gubernamental conocido como NNI<sup>9</sup> (*National Nanotechnology Initiative*) diseñado para financiar la investigación innovadora en esta nueva disciplina. Igualmente en Europa, una de las líneas prioritarias del Séptimo Programa Marco de la U. E. es la Nanociencia. Hay que resaltar aquí, además que la Nanotecnología no sólo ha contado con apoyo económico por parte del sector público, sino también del sector privado, algo que puede considerarse como un buen indicador de las expectativas puestas en este campo como creador de riqueza. Se podría hacer un paralelismo entre esta situación, y lo ocurrido con el campo de la genética y genómica a principios de los años noventa. Algunos expertos ven en la Nanotecnología el motor de la próxima revolución industrial<sup>2</sup>.



**Figura 2.** Disciplinas que engloban la Nanociencia y la nanotecnología<sup>10</sup>.

Un aspecto fundamental que caracteriza la Nanotecnología es su destacado carácter multidisciplinar y transversal, puesto que abarca un amplio rango de conceptos, técnicas, herramientas y aplicaciones potenciales procedentes de campos científicos muy variados. Entre las disciplinas básicas que convergen en la Nanotecnología (*Ver Figura 2*) se encuentran, la física, la química, la biología, la medicina y la ingeniería, entre muchas otras<sup>2</sup>.

### A.1.1 Definición.

Fue en 1959 cuando el físico estadounidense Richard Feynmann<sup>11</sup>, en su conferencia titulada "*There is plenty of room at the bottom*", especuló con la posibilidad

de manipular los materiales a escala atómica y molecular con herramientas diminutas para reordenar átomos y moléculas.

*“...las leyes de la física, hasta donde yo puedo comprender, no nos prohíben la posibilidad de manipular la naturaleza átomo por átomo...no es un intento de violar ninguna ley...pero en la práctica, no se ha hecho porque somos muy grandes...los problemas de la química y la biología pueden ser en gran parte resueltos si nuestra habilidad para ver lo que estamos haciendo y para hacer cosas a nivel atómico finalmente es desarrollada...un desarrollo el cual creo que finalmente no puede ser evitado...”*

Más tarde en 1974, el japonés Norio Taniguchi<sup>12</sup> nombró este campo como “Nanotecnología”.

Considerando el amplio abanico de herramientas, materiales, procesos y aplicaciones que se pueden situar dentro del ámbito de la escala nanométrica, puede resultar complejo elaborar una definición de Nanociencia y Nanotecnología que satisfaga a todos los investigadores y tecnólogos que trabajan en dichas disciplinas. En cualquier caso, dentro de las distintas definiciones que han aparecido del término Nanociencia, una que puede ser bastante completa y precisa es la propuesta por la *Phantoms Foundations*<sup>13</sup>, según la cual se puede definir la **Nanociencia** como la ciencia del análisis y manipulación de materiales a nivel atómico o molecular, donde las propiedades físicas o químicas se diferencian significativamente de las presentadas a escala mayor<sup>7</sup>. Otra definición alternativa, más general, considera a la Nanociencia como aquella ciencia basada en las diversas estructuras de la materia cuyas dimensiones están por debajo de  $10^{-9}$  m, es decir, una billonésima (americana) parte de metro<sup>14</sup>.

En cuanto a la **Nanotecnología**<sup>15</sup>, la Royal Society of Science la define como la rama de la tecnología que se basa en el diseño, caracterización y uso de estructuras, de dispositivos y de sistemas cuya forma o tamaño se controla a escala nanométrica (nanoescala). En un sentido mucho más amplio, la Nanotecnología<sup>2</sup> estaría constituida por una combinación de técnicas de muy diversa procedencia cuya finalidad es la investigación y desarrollo tecnológico a nivel atómico, molecular y supramolecular destinados a proporcionar entendimiento fundamental de los fenómenos y los materiales en la nanoescala (tamaño entre 1-100 nm), y poder así crear y usar estructuras, dispositivos y sistemas con nuevas propiedades y funciones originadas por el particular comportamiento de la materia cuando su tamaño deja de considerarse macroscópico. Otra definición alternativa<sup>16</sup> dada recientemente para la Nanotecnología es la posibilidad de observar, medir, manipular y fabricar bienes a escala nanométrica.

Dejando a un lado la nanoescala, en una definición dada por Brune<sup>17</sup>, se considera que la Nanotecnología comprende las aplicaciones de la Nanociencia, mientras que la Nanociencia trata de los sistemas funcionalizados, bien basados en el uso de sub-unidades que tienen propiedades específicas dependientes del tamaño o bien en subunidades funcionalizadas individuales o combinadas. Aunque ambos términos tienen su propia entidad, es el de Nanotecnología el que más ampliamente se ha usado, al englobar tantos conocimientos básicos como aplicados.

A pesar de las numerosas definiciones existentes para la Nanotecnología, la EPA (*Environmental Protection Agency*) utiliza la empleada por la NNI, que considera que un desarrollo se encuentra dentro del ámbito de la Nanotecnología solamente si implica los siguientes procesos:

- a) Investigación y desarrollo tecnológico a nivel atómico, molecular y macromolecular, en rango de la escala de longitud entre 1 y 100 nm.
- b) Creación y empleo de estructuras, dispositivos y sistemas que poseen propiedades y funciones novedosas debido a su reducido tamaño (nm).
- c) Posibilitar el control o manipulación en la escala nanométrica.

Para terminar esta visión del concepto actual, incluiremos la definición dada por la Comisión Europea<sup>18</sup> que considera a la Nanociencia y la Nanotecnología (de forma conjunta) como un compendio de nuevos enfoques de la investigación y el desarrollo cuya finalidad es controlar la estructura fundamental y el comportamiento de la materia en el nivel de los átomos y moléculas. Esto ofrece, por un lado, la posibilidad de ampliar el conocimiento de los fenómenos a escala atómica/molecular y, por otro, desarrollar nuevos materiales y dispositivos con propiedades, funciones y resultados innovadores, que se diferencian significativamente de las esperadas para tales materiales/dispositivos a escalas de dimensiones por encima de los nanómetros.

### **A.1.2 Impacto Social de la Nanociencia y Nanotecnología.**

En pocos años lo “*nano*” ha pasado de ser un tema casi desconocido a ser objeto de extensos reportajes en medios de comunicación y revistas de divulgación científica. Las implicaciones sociales de una nueva Ciencia y Tecnología, se miden a través de la capacidad de estas disciplinas para generar aplicaciones o dispositivos los cuales introduzcan cambios importantes en los hábitos de las personas<sup>2</sup>. El mencionado éxito actual de la Nanociencia y Nanotecnología se puede medir fácilmente simplemente recogiendo, a modo de ejemplo, varias aplicaciones de distintos campos científico-

tecnológicos que hacen uso de desarrollos surgidos en el ámbito de la Nanociencia y Nanotecnología.

a) **Optimización de procesos productivos:** el empleo de la nanotecnología permite actualmente **reducir tanto la cantidad de materia prima empleada** como aumentar la eficiencia de multitud de procesos químicos, p. ej. el uso de catalizadores en la producción de derivados del petróleo. Además, dispositivos basados en la nanotecnología podrían mejorar el filtrado de partículas contaminantes de aguas y aire. Todas estas mejoras pueden contribuir a consolidar métodos de producción con un menor impacto medioambiental, ahorrando recursos energéticos y materias primas<sup>19</sup>. Además, ya se emplean estructuras nanométricas para mejorar el tratamiento y la remediación de los contaminantes ambientales. Una de las aplicaciones más importantes de los nanomateriales es su uso como catalizadores sobre superficie sólida. Hay muchas reacciones químicas que solamente pueden tener lugar sobre la superficie del catalizador, por lo que si trabajamos a escala nanométrica se incrementa el área superficial de la nanopartícula, y por lo tanto la actividad catalítica. Ya se ha fabricado un filtro, a base de fibras nanométricas de alúmina capaz de retener partículas desde tamaños micrométricos hasta nanométricos pero a velocidades de flujo mayores que las empleadas en las membranas ya existentes<sup>20</sup> (*Argonide Corporation*). Las posibilidades de esterilización (retención 99,99 % de los virus) que puede proporcionar el uso de un filtro de este tipo son importantes a nivel mundial ya que permitiría a cualquier persona beber agua limpia, y así reducir el número de muertes por enfermedades causadas por patógenos (p. ej. la diarrea). En esta línea se comercializan vendajes o apósitos antimicrobianos con nanopartículas de plata.

b) **Tecnologías de la Información:** la implantación de nanosistemas dedicados a la adquisición, análisis y transmisión de datos seguirá contribuyendo a la evolución de la sociedad digital (p. ej. fabricación de dispositivos con nuevos materiales como el grafeno). Actualmente Kodak fabrica OLED (*Organic light emitting diodes*), un material que permite obtener pantallas más finas y eficientes. Los nanocristales que componen este material absorben de forma más eficiente la luz, lo que permite alcanzar grandes densidades ópticas mientras se mantiene un tamaño del film nanométrico.

c) **Ciencias de los materiales:** La nanotecnología permite el desarrollo de nuevos materiales pero también puede mejorar las propiedades de los ya existentes.

Existen materiales nanoestructurados que ya se utilizan en cosméticos, arcillas, recubrimientos, pinturas y herramientas de corte. Algunos nanomateriales que se encuentran presentes en la vida cotidiana son *nanocomposites* para incrementar la dureza y la tenacidad en herramientas de corte. La marca comercial Wilson (Chicago, EE. UU.) comercializa pelotas de tenis con un recubrimiento de nanocomposite (mezcla de caucho de butilo y nanopartículas de arcilla). General Motors (EE. UU.) y Toyota (Japan) incorporan materiales nanoestructurados en algunos de sus vehículos, ya que proporcionan una mayor resistencia a los rasguños, y por otro lado mayor ligereza lo que repercute directamente en el consumo de combustible. Otra empresa *Nanotex* ha desarrollado tejidos a base de nanofibras que evitan que los materiales causantes de la suciedad se adsorban a la ropa. El sector alimentario también ha incorporado algún tipo de nanomateriales: los aditivos o vitaminas poco solubles en agua se pueden convertir a la forma de nanopartículas y hacerlos más solubles en medio acuoso. Existen algunos cosméticos o protectores solares que incorporan nanopartículas, en concreto de óxido de zinc, como bloqueantes de la luz ultravioleta.

d) Una de las grandes expectativas de la Nanotecnología se dirige hacia el desarrollo de “*nanosensores*” orientados a multitud de aplicaciones: control en tiempo real de la calidad de las aguas o la atmósfera, monitorización de las condiciones medioambientales en viviendas o fábricas, mejora de sistemas de seguridad. Además, las posibles aplicaciones en Medicina permitirían mejorar las técnicas de diagnóstico, gracias a la monitorización rápida, fiable y simultánea de varios parámetros. La irrupción de la Nanotecnología en el campo biomédico incidirá directamente en el ser humano mediante mejoras en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades. Se está trabajando en la construcción de dispositivos nanométricos capaces de liberar el fármaco que contienen de forma local, es decir, en la zona donde reside el problema a tratar. Se trataría de una combinación entre un sensor de la zona, la estructura que contiene el fármaco y un propulsor (desde luego, los exámenes y procedimientos de validación médica son muy rigurosos, y por lo tanto el avance en este campo se espera que sea más lento).

Como colofón a este apartado del impacto social cabe mencionar que en la información proporcionada acerca de la Nanotecnología por uno de los laboratorios punteros de investigación en USA (*Los Álamos National Laboratory*) se recoge<sup>21</sup>: “*The new concepts of nanotechnology are so broad and pervasive, that they will influence every area of*

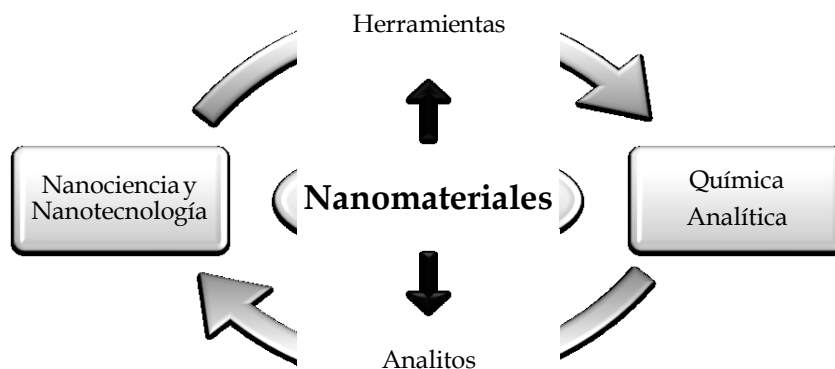
*technology and science, in ways that are surely unpredictable. We are just now seeing the tip of the iceberg in terms of the benefits that nanostructuring can bring. The total societal impact of nanotechnology is expected to be greater than the combined influences that the silicon integrated circuit, medical imaging, computer-aided engineering, and man-made polymers have had in this century*". Sin embargo, a pesar de las prometedoras perspectivas de la nanotecnología, también se pueden presentar otros puntos controvertidos: nadie sabe realmente que efectos dañinos pueden tener los nuevos materiales para los organismos vivos, el hombre o el medio ambiente. Los pesticidas químicos no se consideraban dañinos cuando se empezaron a usar en las primeras décadas del siglo veinte, sin embargo, no fue hasta los años sesenta o setenta cuando se entendieron sus efectos perjudiciales en determinadas condiciones. De forma similar, los efectos a largo plazo de las posibles aplicaciones biomédicas y la posibilidad de que estos nanomateriales sean o no biodegradables no están todavía muy claras. Hay que recordar que se trata de materiales con un tamaño del orden de muchos de los componentes celulares o proteínas, y se desconoce en la mayoría de los casos si las defensas naturales del cuerpo humano pueden detectar y responder adecuadamente ante la presencia de estas nanoestructuras<sup>6,22</sup>.

### **A.1.3 Nanociencia y Química Analítica.**

Así pues, la Nanociencia es un campo multidisciplinar en el cual la Química Analítica tiene un papel primordial como ciencia básica para la caracterización y la medida. Entre los objetivos de la Química Analítica esta el desarrollo de nuevos métodos de análisis o bien la mejora de los métodos ya disponibles para dar respuesta a los problemas (p. ej. ambientales) que se planteen derivados del uso de tales nanomateriales. Cada día son mayores los requisitos de calidad científica y técnica de la información (bio)química demandada, por lo que el descubrimiento y desarrollo de nuevas herramientas de análisis y nuevos procedimientos analíticos para este nanomundo sería de gran utilidad<sup>23</sup>.

Curiosamente, el empleo de los nanomateriales puede contribuir bien a la simplificación de procesos analíticos o al desarrollo de nuevos métodos de análisis. Es por todo esto que la Nanociencia y la Nanotecnología, no solo necesitan de la Química Analítica para la adecuada caracterización de nanomateriales. Además esos nanomateriales pueden ofrecer una de las vías más prometedoras en el desarrollo actual de la Química Analítica<sup>24</sup> (Figura 3): los nanomateriales se pueden emplear como

herramientas útiles para la optimización de cualquiera de las etapas del proceso analítico, o en otra vertiente son los propios nanomateriales quienes pueden ser el objeto del análisis.



**Figura 3.** *Relación entre la Química Analítica y la Nanociencia.*

En el primer caso se pretenden explotar las propiedades de los nanomateriales para contribuir a una mejora de la selectividad, rapidez, miniaturización o portabilidad de un sistema analítico. Se puede incorporar el nanomaterial en el proceso de tratamiento de muestra (p. ej. purificación y preconcentración), en la separación de analitos (p. ej. como fase estacionaria en cromatografía) o incluso en la detección (p. ej. nanopartículas de oro y nanotubos de carbono en electroquímica). En el segundo caso la Química Analítica ofrece la posibilidad de extraer información fisicoquímica complementaria a la información de carácter puramente físico proporcionada habitualmente por las técnicas físicas de caracterización.

Algunos nanomateriales se han incorporado en distintos bienes de consumo (producción de cosméticos, pinturas, alimentos, catalizadores, recubrimientos, electrónica), estableciéndose desde ese momento su producción a gran escala. De ahí surge la preocupación sobre su potencial liberación y las posibles repercusiones que pueda tener sobre el medio ambiente. Son por tanto necesarios estudios sobre la toxicidad de las nanopartículas a lo largo tanto de su producción como de su aplicación. Otro factor a tener en cuenta es el tamaño nanométrico de estos materiales, su elevada área superficial se puede convertir en un inconveniente desde un punto de vista biológico: los nanomateriales son mucho más reactivos y pueden tener acceso a regiones de los sistemas biológicos inaccesibles a partículas de mayor tamaño. Estudiar a fondo el proceso de interacción de las nanopartículas con los sistemas biológicos es



claramente otra forma de caracterizar los nanomateriales, tratando de establecer una buena correlación entre sus propiedades fisicoquímicas y los efectos biológicos que provocan.

En el caso de algunos nanomateriales disponibles comercialmente hoy en día (QDs, nanotubos de carbono) las empresas fabricantes apenas proporcionan información sobre la distribución de tamaños o diámetros y longitudes. El desarrollo de métodos efectivos para un análisis rápido y una caracterización complementaria es cada vez más importante y necesaria. La mayoría de las técnicas de caracterización utilizadas (p. ej. TEM, AFM) proporcionan información de carácter puramente físico, por lo que una caracterización más precisa (química, biológica, etc.) de los materiales nanoestructurados es hoy un tema de extraordinario interés. En definitiva, la necesidad de la Química Analítica en Nanotecnología y la utilidad de la Nanotecnología para nuevos métodos de análisis son hoy evidentes.

Entre los nanomateriales disponibles hoy, las nanopartículas más empleadas en Química Analítica incluyen: nanopartículas de sílice, nanopartículas de carbono (fullerenos y nanotubos de carbono), nanopartículas poliméricas orgánicas (molecular imprinted polymers), nanopartículas metálicas (quantum dots, nanopartículas de oro). Además, hoy hay otro tipo importante de nanomateriales a tener en cuenta en Química Analítica: las nanopartículas híbridas<sup>25</sup>, es decir, nanomateriales bien organizados que constan de dos o más tipos de nanocomponentes individuales.

### **A.1.4 Tipos de Nanomateriales y Nanoestructuras de Aplicación en Química Analítica.**

La definición de un nanomaterial es todavía controvertida y dependiente de la perspectiva y del origen<sup>26</sup>. En principio, un nanomaterial es cualquier material (biótico u abiótico, aunque no químico) con al menos una de sus dimensiones inferiores a 100 nm. Se han propuesto diversos términos y nomenclaturas para describir los materiales en la nanoescala, aunque siempre se habla de un límite máximo de 100 nm. Sin embargo, hoy está aceptado que es preciso dar una definición más completa con información más precisa sobre los nanomateriales a definir, tal como el intervalo o distribución de tamaños o sus propiedades específicas (eléctricas, ópticas o mecánicas). Además cuando las nanopartículas se emplean como "*reactivos*" o simples plataformas, no deberían ser empleadas sin conocer su composición o su estructura (caracterización). De ahí que el análisis de nanopartículas, a pesar de los continuos

avances, constituye hoy por hoy un reto y proporcionar como único dato acerca de la caracterización de una cierta nanopartícula la medida de Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM) no debería ser suficiente<sup>27</sup>. Los químicos analíticos han contribuido poderosamente en el campo de la síntesis de nuevas nanopartículas, y en el desarrollo de los nuevos esquemas de medida. Es importante subrayar que cualquiera que sea la aplicación y naturaleza las nanopartículas, estas deberían poseer una composición conocida y estable o, en caso de modificarse, su comportamiento debería haber sido estudiado, y conocido de antemano<sup>27</sup>. La EPA (Environmental Protection Agency, USA) propone catalogar los principales tipos de nanomateriales existentes en la actualidad, así como los que se espera que aparezcan en un futuro próximo<sup>28</sup>, en cuatro categorías: materiales de base carbono, materiales de base metálica, dendrímeros y composites.

#### A) Materiales de base de carbono

Lógicamente estos materiales están compuestos mayoritariamente de carbono, y normalmente se pueden presentar en forma de esferas huecas, elipsoides o tubos. Los nanomateriales que presentan forma esférica y elipsoidal, se conocen con el nombre de fullerenos, mientras que los que tienen forma cilíndrica se llaman nanotubos. Este tipo de nanomateriales tiene muchas aplicaciones potenciales: mejora de recubrimientos y láminas, materiales más duros y ligeros, etc. Dentro de este grupo estarían los nanotubos de carbono, que pueden llegar a ser más duros que el acero, pero al mismo tiempo más flexibles y ligeros. Por ejemplo, hoy se baraja este material como un posible sustituto del silicio como semiconductor en la industria de la tecnología de la información.

#### B) Materiales de base metálica

En esta categoría se incluyen las nanopartículas de oro, plata u óxidos metálicos como el  $\text{TiO}_2$ , y también los quantum dots (QDs), las características de este tipo de materiales se trataran ampliamente en un apartado posterior de la presente Tesis Doctoral.

#### C) Dendrímeros

Estos nanomateriales son polímeros a escala nanométrica contruidos a partir de unidades ramificadas. La superficie del dendrímero posee numerosas cadenas finales, las cuales pueden ser diseñadas para poseer unos determinados grupos químicos. Esta propiedad puede ser útil también en catálisis. Hay que destacar que los dendrímeros tridimensionales contienen cavidades en su interior, en las cuales se

pueden incluir otras moléculas (esto podría resultar de gran utilidad en la administración efectiva de fármacos en el organismo vivo).

### D) Composites

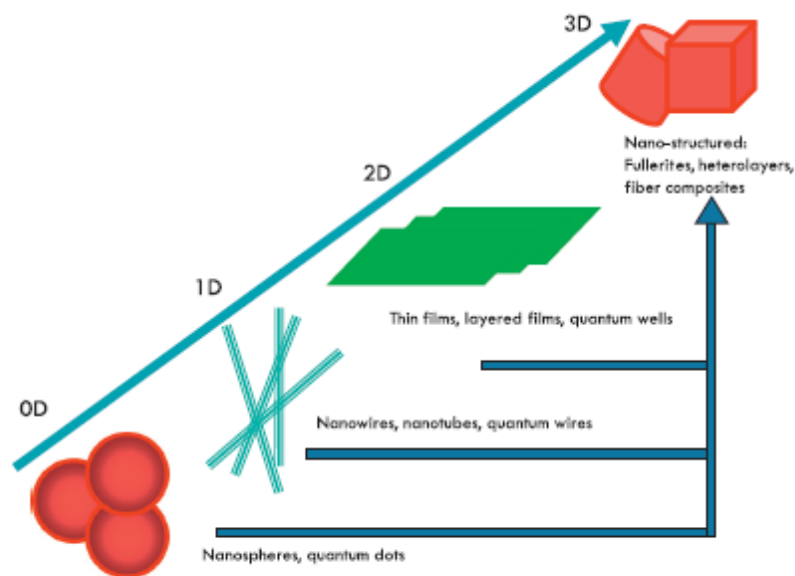
Los materiales tipo composites combinan nanopartículas entre sí o con otros materiales de mayor tamaño o a escala macrométrica. Nanopartículas, como las arcillas nanoestructuradas, ya se añaden a algunos productos desde piezas de automóviles a embalajes de mercancías, para mejorar las propiedades mecánicas, térmicas o ignífugas. Las propiedades que presentan este tipo de nanomateriales sintetizados por el hombre son únicas, ya que proporcionan nuevas características eléctricas, catalíticas, magnéticas, mecánicas, térmicas que son deseables para aplicaciones en sectores tales como la medicina, el comercio, el medioambiente o para aplicaciones en el campo militar.

#### A.1.4.1 Clasificación de los Nanomateriales.

Existen diferentes clasificaciones propuestas para los nanomateriales en función de distintos criterios. Si atendemos a su **composición** podemos tener: elementos, compuestos, mezclas o aleaciones. En cambio si nos centramos en su química o **método de síntesis** podemos tener materiales orgánicos, inorgánicos, biomateriales o supramoleculares. En función de su **crystalinidad**, podemos tener materiales amorfos, cristalinos, mixtos, microcristalino o nanocristalino. Empleando como criterio de clasificación una **propiedad del material** tenemos: ópticos, térmicos, mecánicos, catalíticos, biológicos, sensores, eléctricos y magnéticos.

La clasificación más extendida se basa en establecer una clasificación de los nanomateriales en función de sus **dimensiones** (Ver Figura 4), así tenemos estructuras 0D, 1D, 2D, 3D. Las **nanoestructuras 0D** se refieren a materiales completamente nanoestructurados, con todas sus dimensiones dentro de la escala nanométrica (p. ej. nanopartículas metálicas, QDs, algunos materiales orgánicos como los dendrímeros, óxidos como el TiO<sub>2</sub> o algún material híbrido a partir de estos mismos). Dentro de las **nanoestructuras 1D** nos encontramos con los nanotubos de carbono, nanoalambres o nanovarillas, el criterio de clasificación en este caso es que una de las dimensiones del material es de tamaño micro/macrométrico. En el grupo de **nanoestructuras 2D** los materiales poseen dos dimensiones dentro de la escala micro/macrométrica, p. ej. nanorecubrimientos superficiales y películas delgadas de nanocapas. Finalmente en las **nanoestructuras 3D**, las tres dimensiones del material están fuera de la escala

nanométrica, por encima de los 100 nm, pero estos materiales están formados por agrupaciones de los materiales de los grupos mencionados anteriormente.



**Figura 4.** Clasificación de las nanoestructuras en función de sus dimensiones<sup>29</sup>.

#### **A.1.4.2 Nanomateriales de uso habitual en Química Analítica.**

Entre los nanomateriales más empleados en el ámbito de la Química Analítica se encuentran los siguientes: los quantum dots (QDs), las nanopartículas de oro (AuNPs) y plata, los nanotubos de carbono (CNT) y las nanopartículas magnéticas.

Los QDs son, sin duda, los nanomateriales más utilizados hasta la fecha para fines analíticos. Algunas de las aplicaciones más relevantes de este tipo de nanomaterial incluyen su uso como: marcadores fluorescentes en la detección de células o componentes celulares, en procesos de toma de imágenes, en medidas de distancias intermoleculares mediante transferencia de energía (FRET), marcadores en inmunoensayos, etc. Este tipo de nanopartículas se irán describiendo en más detalle a lo largo de la presente Tesis Doctoral, por constituir la base de la investigación desarrollada en dicha Tesis.

Otro tipo de nanopartículas de gran relevancia en Química Analítica son las **nanopartículas de plata y oro**. Las nanopartículas metálicas de oro o plata deben su color al movimiento de los electrones en la banda de conducción (surface plasmon oscillation), la absorción de radiación tiene lugar a una frecuencia típica de la región visible de modo que presentan una fuerte absorbancia de SPR (Surface Plasmon Resonance). Esta “absorción por resonancia de plasmón electrónico” tiene un

coeficiente de absorción que es órdenes de magnitud superior al de los colorantes clásicos fuertemente absorbentes. El movimiento colectivo de los electrones de la banda de conducción se invierte en la superficie de la nanopartícula (cambio de polaridad) después de que la luz incida sobre la misma. Dicha banda de plasmón constituye un excelente diagnóstico de la agregación de NPs, pudiendo emplearse para llevar a cabo la determinación de cualquier analito que promueva dicha agregación de las nanopartículas<sup>30</sup>.

Las nanopartículas de plata, gracias a sus excelentes propiedades eléctricas, térmicas, catalíticas y ópticas se han empleado ampliamente como conductores, catalizadores, y para sensores químicos. Las nanopartículas de oro ofrecen un entorno óptimo para la inmovilización estable de biomoléculas en su superficie, no sólo conservando su actividad, sino asegurando una elevada área específica que amplifica señal analítica. Su uso es especialmente apropiado en aplicaciones electroquímicas ya que, además, facilitan la transferencia de electrones entre las proteínas inmovilizadas y la superficie del electrodo, y potencia la electrocatálisis de los procesos redox (p. ej.  $\text{H}_2\text{O}_2$ )<sup>31</sup>. Por todas estas propiedades, las nanopartículas de oro se han empleado como marcadores en técnicas de imagen en biomedicina, en el desarrollo de tests de diagnóstico, y como catalizadores.

Las **nanopartículas magnéticas**, p. ej.  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ , facilitan la implementación de técnicas de separación sencillas basadas en su interacción con campos magnéticos y se han empleado en distintos ensayos que requieran purificaciones y preconcentraciones (p. ej. en el reconocimiento de bacterias o patógenos<sup>32</sup>) sobretodo empleando inmunoensayos<sup>33</sup> en los cuales nanopartículas son modificadas con anticuerpos para la captura, separación y detección del analito de interés. La gran versatilidad de estas nanopartículas las convierte en una herramienta poderosa para aplicaciones importantes en medicina, biotecnología y química ambiental.

Los **nanohilos** son nanomateriales constituidos por hilos cilíndricos sólidos con un diámetro típicamente menor de los 100 nm. Desde el punto de vista electroquímico los mecanismos de transporte de electrones están influenciados por el diámetro del hilo, las condiciones de la superficie, la estructura del cristal y su calidad, su composición química, y la orientación cristalográfica a lo largo del eje del hilo. Concretamente estas nanoestructuras de óxidos metálicos se han empleado en el desarrollo de sensores de gases<sup>34</sup>. La detección del gas se debe a un efecto en la superficie del nanomaterial, se produce un cambio en la resistencia en la superficie del

material, de modo que cuanto mayor es la relación superficie volumen mayor es la respuesta.

Los **nanotubos de carbono** son un material nanoestructurado que posee excelentes propiedades mecánicas, eléctricas y térmicas. Dichos nanotubos, con una elevada longitud respecto al diámetro, están formados por átomos de carbono unidos covalentemente. Son insolubles en medios acuosos, se agregan de forma espontánea, aunque son solubles en un número limitado de disolventes (p. ej. dimetilformamida). Se pueden funcionalizar covalentemente, aunque por lo general los nanotubos de carbono no son reactivos más que en condiciones químicas fuertes (pudiendo incorporarse en tales condiciones grupos carboxilo o hidroxilo). Sus propiedades de fisisorción (adsorción sobre su superficie por medio de interacciones  $\pi$  o de Van der Waals) los hacen buenos candidatos para la filtración de gases o detección de analitos volátiles (sensing). Se caracterizan por una buena estabilidad térmica, y una elevada movilidad y conductividad eléctrica, gracias a los electrones  $\pi$  pueden ser portadores de mayores cantidades de corriente con una resistencia mínima por su tamaño. Se pueden emplear<sup>35</sup> como tensoactivos para mejorar las separaciones de electroforesis capilar, como transistores de efecto campo, o en sensores electroquímicos. Sin duda el campo donde se han empleado más ampliamente ha sido en Electroquímica, ya que facilitan la transferencia de los electrones en reacciones electroquímicas y presentan una elevada conductividad eléctrica.

Por otra parte, se han utilizado también, con menor profusión, **nanoestructuras 2D** en el desarrollo de sensores químicos. Algunos de estos materiales son láminas estrechas sintetizadas a partir de la deposición de vapor (evaporación térmica), monocapas autoensambladas mediante reacciones de quimisorción entre la superficie y el adsorbato, capas ensambladas mediante interacciones electrostáticas. La importancia analítica de estos materiales nanoestructurados especiales reside en que proporcionan un componente muy valioso para construir nanosensores<sup>36</sup>.

Dentro de las aplicaciones generales en Química Analítica los materiales nanoestructurados juegan un papel particularmente importante en el área de la tecnología de sensores (bio)químicos. La sensibilidad y la relación señal/ruido en muchos casos mejora significativamente empleando estos materiales que facilitan el desarrollo de nuevas estrategias en dicho campo<sup>37</sup>. Conviene diferenciar aquí Nanotecnología y Nanomateriales: la Nanotecnología representa las nuevas estrategias y posibilidades para la construcción de sensores y su manipulación, así como para el

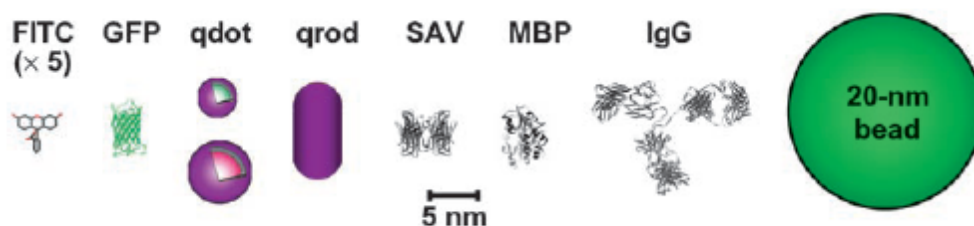
desarrollo final de nuevos bioensayos. En el caso de los nanomateriales se circunscriben a su empleo concreto para inmovilizar enzimas, antígenos, ácidos nucleicos, para obtener superficies transductoras electroquímicas (para promover las reacciones de transferencia de electrones) y para amplificar y orientar la señal analítica de los eventos de reconocimiento. Se han publicado ya interesantes aplicaciones de sensores electroquímicos nanoestructurados, biosensores, e inmunosensores de gran interés en medicina (p. ej. para el diagnóstico y detección de organismos infecciosos), en monitorización medioambiental (detección de pesticidas, metales pesados, moléculas genotóxicas) y en la monitorización de la calidad de los alimentos (toxinas, organismos modificados genéticamente).

Otra tendencia actual en el empleo de NPs en el ámbito de la Química Analítica lo constituyen las **nanopartículas híbridas**<sup>25</sup>, es decir, aquellas que se obtienen de la conjugación o combinación de dos materiales de diferentes propiedades en la misma partícula. Si combinamos dos tipos diferentes de nanopartículas puede tener lugar un efecto sinérgico que conduzca a la incorporación o mejora de las propiedades de los dos materiales, o por otro lado, quizás permitir explotar las propiedades de forma individual de los dos materiales. Un ejemplo ilustrativo lo constituyen las NPs con un núcleo metálico recubierto de un material magnético que se podrían emplear para mejorar los contrastes en resonancia electrónica (o para mejorar las señales de SERS). Además, una estructura inversa permitiría hacer uso de las propiedades de la química superficial de las nanopartículas metálicas, más conocida, para funcionalizar las nanopartículas magnéticas e incrementar así las aplicaciones potenciales. Así, las nanopartículas magnéticas recubiertas con oro y la inmovilización de anticuerpos sobre la superficie de oro proporciona la capacidad de reconocimiento, y el núcleo magnético la posibilidad de separar las proteínas de interés (reconocidas por el anticuerpo) del medio biológico complejo en que se hallan.

Una estrategia similar se puede emplear con nanotubos de carbono y nanopartículas magnéticas. Aprovechando la capacidad de adsorción de los nanotubos, y la separación a través de nanopartículas magnéticas podríamos llevar a cabo la toma de muestra y la limpieza de la misma en un solo paso<sup>38</sup>. Otra combinación posible sería emplear conjuntamente QDs y las nanopartículas magnéticas para conseguir medidas de fluorescencia óptica y resonancia magnética de forma simultánea.

## A.2 QUANTUM DOTS.

Los Quantum Dots (QDs) son materiales coloidales nanoestructurados, también conocidos como nanocristales semiconductores, nanopartículas semiconductoras, semiconductores nanométricos y átomos artificiales. Estos materiales nanoestructurados poseen todas sus dimensiones en la escala nanométrica, y están formados a base de elementos químicos de los grupos II-VI, III-V o IV-VI. Su forma es aproximadamente esférica con tamaño típicamente en el orden de 1 a 12 nm de diámetro, y están formadas por grupos de entre cientos y miles de átomos<sup>39</sup> rodeados de una capa exterior de moléculas de tensoactivo o ligandos<sup>40</sup>.

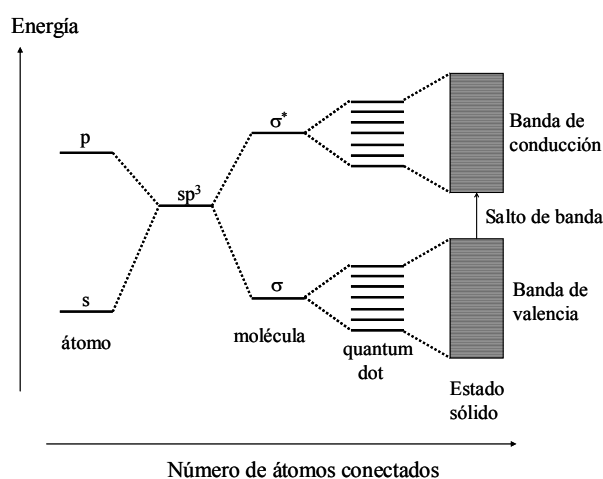


**Figura 5.** Comparación entre el tamaño de los QDs y otros compuestos: FITC (Fluorescein isothiocyanate), CdSe/ZnS (verde: 4 nm diámetro; rojo 6,5 nm diámetro), qrod (QD en forma de barra), SAV (Streptavidina ~ 60 kDa), MBP (Maltose Binding Protein ~ 40 kDa), IgG (inmunoglobulina G ~ 150 kDa)<sup>41</sup>.

Los QDs son pues materiales inorgánicos que cuando son sintetizados a escala nanométrica presentan un comportamiento intermedio entre el sólido macroscópico y el de un sistema atómico o molecular. En efecto si consideramos el caso de un cristal inorgánico compuesto por unos pocos átomos, sus propiedades diferirán de las que presentaría un único átomo, pero además son también muy distintas a las del sólido a escala macroscópica. Así las propiedades que poseen estas nanopartículas siguen las leyes de la mecánica cuántica en lugar de las de la física clásica, y están determinadas por efecto de confinamiento cuántico de los electrones<sup>1</sup>. De entre todas las nanopartículas existentes en la actualidad podemos afirmar que los quantum dots son, probablemente el sistema a escala nanométrica mejor estudiado. Las dimensiones físicas de un quantum dot pueden ser menores que el diámetro del plasmón (par  $e-h$ ), por lo que se les puede considerar un ejemplo de “partícula en una caja” donde los niveles de energía están cuantizados y varían en función del tamaño de dicha caja<sup>42</sup>, es decir, los niveles de energía del QD están cuantizados y relacionados con el tamaño físico del mismo. Este efecto se conoce como **confinamiento cuántico**.



El fenómeno de confinamiento cuántico a través del concepto de **dualidad onda partícula**<sup>43</sup>: en el semiconductor a escala macroscópica los electrones de la banda de conducción (y los huecos de la banda de valencia) son libres para moverse a través del cristal, y su movimiento puede ser descrito mediante ondas cuyas longitudes de onda son generalmente del orden de nanómetros. Es decir, que siempre que el tamaño del semiconductor sólido llegue a ser del orden de las longitudes de onda asociadas a los portadores (electrón y hueco), un conductor libre confinado en esta estructura se comportará como una partícula en una caja. En definitiva, los niveles de energía de la partícula no pueden tomar cualquier valor arbitrario sino que el sistema presenta un espectro discreto de niveles de energía. Si todas las dimensiones del cristal semiconductor se reducen a unos pocos nanómetros, el sistema resultante se conoce como *quantum dot*.



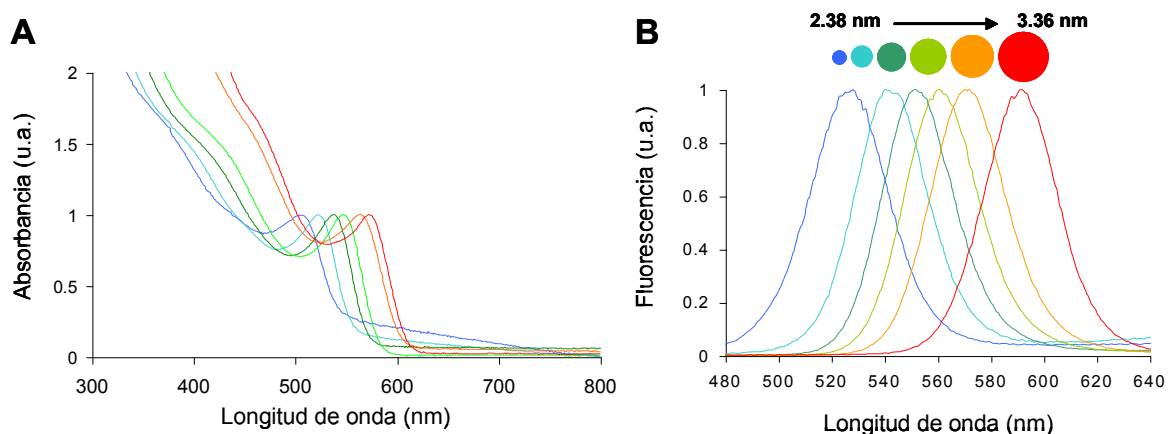
**Figura 6.** Diagramas de niveles de energía en función del número de átomos. A medida que aumenta el número de átomos, los niveles discretos de los orbitales atómicos se convierten en bandas de energía.

Con objeto de racionalizar o predecir las propiedades físicas de los materiales a escala nanométrica es preciso conocer su estructura de niveles energéticos. Para los sistemas como los quantum dots, el cálculo de los niveles energéticos se puede llevar a cabo de dos formas: si tomamos el sólido macroscópico y estudiamos la evolución de su estructura de bandas a medida que reducimos el tamaño a unos pocos nanómetros; o bien si comenzamos con los estados electrónicos de un solo átomo de forma aislada y luego estudiamos como los niveles de energía evolucionan a medida que los átomos se aproximan e interaccionan entre sí (Ver Figura 6).

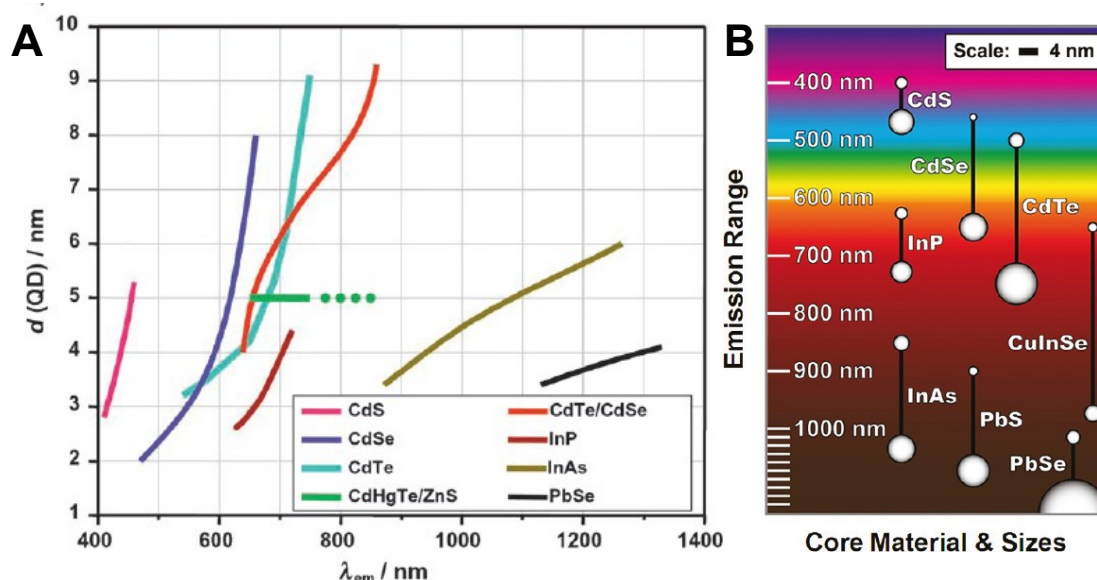
Cuando se combinan varios átomos para formar una molécula, se comienza con niveles de energía discretos de los orbitales atómicos, y se termina por obtener niveles discretos para los orbitales moleculares. Cuando el tamaño del sistema poliatómico se incrementa de forma progresiva, el cálculo de su estructura electrónica en términos de combinación de orbitales atómicos llega a ser inviable. Sin embargo los cálculos se simplifican si el sistema es periódico, en un cristal infinito la estructura energética de un sólido no consiste ya en niveles de energía discretos, sino en bandas de energía como se observa en la Figura 6 donde cada banda puede ser ocupada con un número limitado de portadores de carga. La estructura electrónica de los niveles de energía de un nanocrystal tiene que ser algo intermedio entre los niveles de energía de un sistema atómico y la estructura de bandas del sistema macroscópico. Como se observa en la Figura 6 los niveles de energía de un nanocrystal son discretos, su densidad es mucho más grande, y su espaciado es menor que el correspondiente a los niveles de un átomo. Los niveles atómicos altamente ocupados de las especies atómicas interactúan entre sí para formar la banda de valencia del nanocrystal. Igualmente, los niveles más bajos no ocupados interactúan entre sí para formar la banda de conducción del nanocrystal. El salto de energía entre la banda de valencia y la de conducción da como resultado el salto de banda en el nanocrystal.

En los semiconductores convencionales el salto de banda (band-gap) determina la energía mínima que ha de comunicársele a un electrón para pasar de la banda de valencia (completa) a la banda de conducción (vacía) para un determinado material. En las nanopartículas semiconductoras los niveles están cuantizados y el salto de banda se relaciona con el tamaño del quantum dot; a menor tamaño de nanopartícula el salto de banda es mayor (longitud de onda de emisión menor). Luego las propiedades del semiconductor nanométrico están relacionadas tanto con el tamaño (*Figura 7*) como su composición (*Figura 8*).

La absorción de un fotón con una energía superior a la del salto de banda da lugar a la formación de un excitón (par electrón/hueco). La recombinación radiacional del par, se caracteriza por una vida media relativamente larga (>10 ns) y da lugar a la emisión de un fotón en una banda de energía estrecha y simétrica.



**Figura 7.** Espectro de absorbancia (A) y emisión fluorescente (B) típicos de QDs de diferente tamaño con núcleo de CdSe y recubrimiento de ZnS.

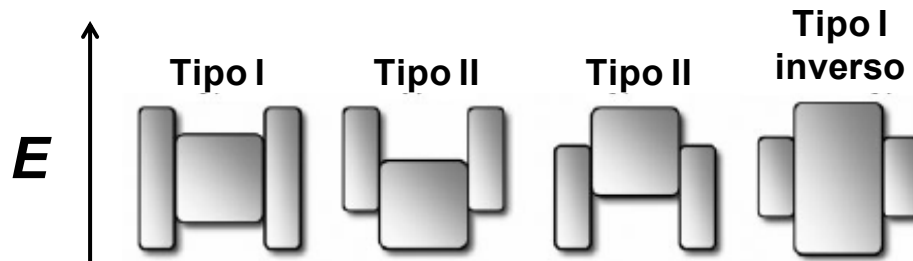


**Figura 8.** A) Correlación del máximo de emisión luminiscente con el tamaño de QDs compuestos de diferentes materiales semiconductores<sup>41</sup>. B) Intervalos de emisión fotoluminiscente aproximados de QDs de diferente naturaleza<sup>44</sup>.

### A.2.1 Composición

Los QDs están generalmente compuestos de materiales semiconductores binarios formados por elementos de los grupos II-VI, IV-VI y III-VI de la Tabla Periódica, como por ejemplo: sulfuro de cadmio (CdS), seleniuro de cadmio (CdSe), telurio de cadmio (CdTe), seleniuro de zinc (ZnSe), sulfuro de plomo (PbS), y el mercurio sulfuro (HgS). También, aunque menos comunes, se han descrito QDs formados por elementos de los grupos III-V de la Tabla Periódica: (p. ej. fosforo de indio (InP), nitruro de galio (GaN), arseniuro de indio (InAs), etc. También hay QDs formados por combinaciones ternarias de los elementos: (p. ej. CdZnS, CdSSe, InNP).

Lo más habitual es trabajar con QDs de estructura tipo núcleo/recubrimiento (core/shell), siendo los más utilizados los QDs de CdSe/ZnS, CdSe/CdS y ZnSe/ZnS. Dependiendo de la posición relativa de las bandas de los materiales que forman el núcleo y el recubrimiento podemos identificar tres tipos básicos<sup>40</sup> de QDs core/Shell: Tipo I, Tipo I inverso, Tipo II.



**Figura 9.** Representación esquemática de la alineación de los niveles de energía de diferentes sistemas core/shell. Los bordes superiores e inferiores de los rectángulos se corresponden con los bordes de las bandas de conducción y valencia del núcleo y el recubrimiento, respectivamente.

En el caso de los QDs **Tipo I**, el salto de banda del material que forma el recubrimiento es mayor que el del material que forma el núcleo, por lo que los electrones y los huecos se confinan en el interior del núcleo. Esta estructura es la típica de los QDs más habitualmente empleada (p. ej. QDs de CdSe/ZnS y CdS/ZnS). El recubrimiento en este caso se utiliza para pasivar la superficie del núcleo con el objeto de mejorar las propiedades ópticas. El recubrimiento separa la superficie del núcleo ópticamente activo del medio que le rodea, por lo que se reduce la sensibilidad de las propiedades ópticas a cambios (moléculas de oxígeno o de agua) en el entorno más próximo a las superficie de la nanopartícula. De esta forma, se reduce el número de enlaces incompletos en la superficie, que pueden actuar como “trampas” para los conductores de carga reduciendo el rendimiento de la fluorescencia.

En los QDs **Tipo I inverso (reverse)** el salto de banda del material empleado para recubrir el núcleo es inferior al salto del banda del material del propio núcleo, por lo que en función del espesor del recubrimiento los huecos o electrones están parcial o totalmente confinados en el recubrimiento. A este grupo pertenecen, entre otras, QDs de naturaleza CdS/HgS, CdS/CdSe y ZnSe/CdSe. En este caso se puede modular la emisión luminiscente de la nanopartícula variando el espesor del recubrimiento. La estabilidad de la fluorescencia y el rendimiento cuánticos de estos sistemas se puede

mejorar añadiendo una segunda capa de un semiconductor con un salto de banda mayor.

Si el límite del borde de la banda de valencia o de conducción de recubrimiento se localiza en el salto de banda del núcleo tenemos los QDs con estructura **Tipo II**. En este tipo de QDs cuando se excita el nanocrystal tiene lugar una separación del electrón y el hueco en diferentes regiones de la nanopartícula, en el espacio entre el núcleo (core) y el recubrimiento (shell), dando lugar a una mayor duración de los excitones antes de la recombinación. Ejemplos en este grupo tenemos QDs de CdTe/CdSe y CdSe/ZnTe. En los tres casos la incorporación de la capa de semiconductor adicional genera un desplazamiento hacia mayores longitudes de onda, pero en el último caso este desplazamiento es más significativo. El interés de este tipo de sistemas reside en la posibilidad de modificar el espesor del recubrimiento para obtener emisiones en la zona del infrarrojo que son difíciles de obtener con otros materiales.

El criterio a tener en cuenta para la elección de materiales en la síntesis de QD tipo core/shell no debe ser únicamente la posición relativa de los saltos de banda de ambos materiales: es importante considerar además que los dos materiales deberían cristalizar en la misma estructura y presentar una continuidad en su estructura cristalográfica (evitar el “*lattice mismatch*”) de las dos estructuras para asegurar la disminución de los defectos superficiales<sup>40</sup>.

### **A.2.2 Comportamiento fotoluminiscente de los QDs: Propiedades y limitaciones.**

Una de las propiedades más explotada de los quantum dots es la intensa emisión luminiscente característica de estos nanomateriales cuya longitud de onda máxima puede ser modificada simplemente mediante el control de su tamaño, con espectros de absorción anchos (como se observa en la Figura 7 con coeficientes de extinción en la zona UV del orden de  $10^5$  a  $10^6$   $M^{-1}cm^{-1}$ ) y bandas de emisión estrechas y simétricas (con anchuras de pico a la mitad del máximo de entre 25 y 35 nm). Si variamos el tamaño y la naturaleza del nanocrystal, podemos generar una emisión luminiscente en un amplio rango espectral, desde el UV hasta el infrarrojo. Además, gracias a sus anchos espectros de excitación se puede llevar a cabo la excitación simultánea de nanopartículas de distinto tamaño, observando la emisión de fluorescencia a longitudes de onda de emisión diferentes.

Otras propiedades ópticas relevantes de los QD son su elevada fotoestabilidad, y unos rendimientos cuánticos (*QY*, Quantum Yield) de la fluorescencia elevados, mejores en el caso de QD tipo core/shell. Los tiempos de vida del fenómeno luminiscente pueden estar en torno a los 10-100 ns. Su elevada fotoestabilidad (frente a los fluoróforos convencionales), permite que sean expuestos a ciclos de excitación más largos, incluso horas, sin pérdida de eficiencia luminiscente.

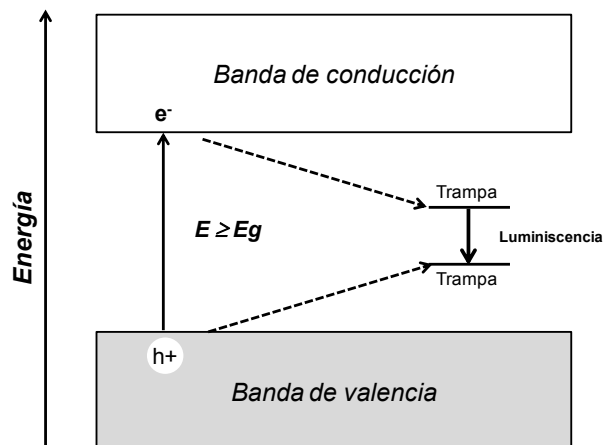
Aunque la dependencia de ciertas propiedades ópticas con el tamaño de las partículas conductoras coloidales ya había sido observada desde principios del siglo pasado, (p. ej. en coloides<sup>45</sup> de CdS), solo a finales del siglo que dicha observación se explicó y racionalizó adecuadamente. Hoy en día podemos confirmar que el incremento en el salto de banda entre la banda de valencia y la de conducción repercute directamente sobre las propiedades ópticas del material.

La energía mínima necesaria para crear un par  $e^-/h^+$  en un quantum dot (excitón) está definida por dicho salto de banda (que a su vez depende del tamaño de la nanopartícula). La absorción de un fotón tiene mayor probabilidad a mayores energías (menores longitudes de onda) y esto genera espectros de absorción anchos<sup>43</sup>.

Los excitones en un semiconductor tienen una vida media limitada debido a la recombinación del par  $e^-/h^+$  (vida media relativamente larga  $> 10$  ns). La energía liberada por la recombinación del excitón es demasiado alta para ser disipada mediante modos vibracionales, por eso se libera en forma de emisión de fotones<sup>43</sup>. Así pues, el decaimiento radiactivo a través de la emisión de fotones, la **fluorescencia**, es un mecanismo de desactivación altamente probable en los quantum dots.

Habitualmente los quantum dots coloidales tienen una baja distribución de tamaños, sin embargo, la anchura a la semialtura de los espectros de emisión fluorescente de los QDs es normalmente del orden de los 25-35 nm. Aunque inicialmente se pensaba que este amplio rango en el espectro de emisión se debía a una distribución de tamaños residual, hoy en día se cree que puede estar relacionado con una propiedad de los quantum dots denominada **blinking**<sup>43,46</sup>. Observando detenidamente de forma continúa la emisión de fluorescencia de un solo QD aislado, vemos que la nanopartícula presenta un comportamiento de encendido-apagado o intermitencia<sup>47</sup>, fenómeno al que se conoce como "*blinking*". En un nanocrystal los periodos de apagado pueden durar desde milisegundos a varios minutos. Se cree que el mecanismo implicado en este proceso puede estar relacionado con la fotoionización Auger.

Otro aspecto importante a tener en cuenta a la hora de estudiar el comportamiento fotoluminiscente de los QDs es la presencia de *defectos de la superficie de la nanopartícula*, los cuales puedan actuar como “trampas” temporales para el electrón o el hueco, desfavoreciéndose así la recombinación radiacional. Estas “trampas” están causados por defectos superficiales incluyendo: vacantes en la estructura cristalina, enlaces interrumpidos, moléculas adsorbidas a la superficie o la presencia de impurezas. El electrón o el hueco pueden quedar atrapados dentro de estos estados de mínima energía, y por lo tanto el proceso de recombinación radiativa ser menos probable<sup>48</sup>. Una solución para minimizar la presencia de estas trampas superficiales consiste en hacer crecer una capa protectora de otro material sobre la superficie del nanocrystal (p. ej. un semiconductor con un salto de banda mayor<sup>40</sup>, obteniéndose así QD tipo núcleo/recubrimiento (core/shell). Dependiendo de las energías relativas de los estados “trampa” comparando con los bordes de las bandas de valencia y de conducción, el electrón o el hueco fotoexcitados pueden interactuar con las moléculas adsorbidas con un mecanismo de transferencia de carga donador-aceptor y propiciar cambios en los tiempos de emisión de los quantum dots<sup>42</sup> (esta es una de las bases de algunas aplicaciones de los QDs para el desarrollo de sensores químicos).



**Figura 10.** Diagrama de niveles de energía que representa la promoción de un electrón desde la banda de valencia a la banda de conducción, generando un hueco ( $h^+$ ).

Así pues, los QDs son un tipo de nanomateriales semiconductores cuyas propiedades optoelectrónicas se encuentran determinadas por efectos de confinamiento cuántico que tienen lugar al sintetizar el material a escala nanométrica. Particularmente estos QDs presentan buenas propiedades eléctricas, permiten un buen transporte de electrones y son activos electroquímicamente. Además, su elevada

relación superficie/volumen favorece su posible acción como catalizadores (fotocatalíticos y electrocatalíticos). Otra posibilidad novedosa es que actúen como fotosensibilizadores, lo que tiene gran interés en el área biomédica para ser utilizados con efecto terapéutico (en terapias fotodinámicas) porque pueden producir, cuando son iluminados, oxígeno singlete citotóxico.

### **A.2.3 Técnicas de Caracterización.**

Las técnicas de caracterización son clave para poder alcanzar un buen grado de reproducibilidad y control sobre las potenciales aplicaciones que se pretendan desarrollar no solo con los QD, sino con cualquier nanomaterial<sup>49</sup>. La correcta caracterización de las nanopartículas es una etapa crucial en el desarrollo de cualquier aplicación para no hacer un uso inadecuado de las nanopartículas<sup>27</sup> tanto en el desarrollo de aplicaciones “*in vitro*” como en aplicaciones “*in vivo*”, tan importantes hoy en el campo de la nanotoxicología<sup>22</sup>.

Los parámetros físico-químicos de mayor interés en la aplicación analítica de los nanomateriales son: tamaño y distribución del nanomaterial, forma, relación de aspecto, estado de agregación, pureza, composición química, características superficiales, zeta potencial o carga total, estabilidad y solubilidad. En caso de que tengan lugar modificaciones posteriores de la nanopartícula (p. ej. bioconjugación), se añadirían otros parámetros que complicarían aún más la ecuación.

En función de la metodología empleada para la caracterización se pueden obtener resultados dispares. Algunos autores han señalado que el tamaño especificado por algunos fabricantes puede variar dependiendo de la metodología empleada para llevar a cabo la caracterización, incluso se han encontrado diferencias de dos órdenes de magnitud<sup>50</sup>. La técnica seleccionada varía en función de si el material es sólido, está disperso, recubierto o incluso incrustado en un material sólido.

Existen pocos métodos estándar para la determinación del tamaño de las nanopartículas, y una aparente falta de consciencia de que no todas las técnicas miden la misma cosa. Existen muchos métodos de caracterización que proporcionan información distinta, pero a la vez complementaria. En este sentido las técnicas basadas en el empleo de la microscopía electrónica resultan fundamentales a la hora de caracterizar los nanomateriales. En efecto mediante el empleo de **TEM** (Transmission Electron Microscopy) y **AFM** (Atomic Force Spectroscopy) permite la medida del tamaño del nanomaterial y nos da información sobre su morfología. Alternativamente



**DLS** (Dynamic Light Scattering) aparece como la técnica de elección cuando se persigue obtener información sobre la distribución de tamaños de las nanopartículas incluyendo el núcleo del nanomaterial, los posibles ligandos que rodean a la nanopartícula para darle estabilidad (medio orgánico o acuoso), así como la doble capa iónica.

El TEM es una técnica de gran importancia en los estudios de superficies debido a su gran poder de resolución. Concretamente en el caso de los QDs el TEM permite tener una medida muy precisa del tamaño del núcleo de la nanopartícula. Si se utiliza **HRTEM** (High Resolution Transmission Electron Microscopy) podemos obtener una medida más precisa del tamaño de nanopartícula, visualizar los límites del entramado cristalino e información cristalográfica sobre la fase y ejes del nanocrystal. Una variante de este tipo de microscopía es la Atomic Number Contrast Scanning Transmission Electron Microscopy (**Z-TEM**) que posibilita la obtención de información estructural y química de una nanoestructura individual a nivel atómico. Se puede determinar la estructura tridimensional de un nanomaterial de menos de 10 nm. El estudio de la morfología de muestras de nanopartículas obtenidos a través de métodos de síntesis diferentes, puede servir para elucidar que condiciones conducirán a los nanocristales de mejores propiedades ópticas y cristalinas. En el caso concreto de QDs tipo core/shell se puede incluso llegar a estimar el espesor de la capa de semiconductor adicional o incluso su heterogeneidad sobre el nanocrystal<sup>51</sup>.

La técnica de **AFM** (Atomic Force Microscopy) permite obtener información sobre la morfología de la muestra (forma y tamaño)<sup>49</sup>. Las imágenes obtenidas proporcionan información sobre el tamaño real del QD, considerando el núcleo y el recubrimiento que rodea a la nanopartícula. La técnica de AFM puede aplicarse a muestras no conductoras y húmedas, y en el caso de muestras bioconjugadas permite obtener información también sobre la topología originada por la biomolécula conjugada o bien sobre las interacciones entre el nanomaterial y la biomolécula.

Para estudiar con detalle las capas de ligandos que recubren la nanopartícula se puede optar por el **RMN** (Nuclear Magnetic Resonance), que permite identificar la presencia de especies sobre la superficie de la nanopartícula, los enlaces ligando-nanopartícula y calcular el grado de recubrimiento de cada ligando sobre la superficie<sup>52</sup>. Esta herramienta permite llevar a cabo la monitorización de reacciones de intercambio de ligandos, ya que la muestra a analizar se encuentra en estado líquido (por lo que no se altera la disposición original de ligandos).

Rutherford backscattering (**RBS**) es una técnica conocida en el campo de los estudios de superficies. Posee una elevada sensibilidad de detección y proporciona de forma muy precisa la composición elemental, por lo que es ideal para determinar la composición del núcleo (core) o del núcleo/recubrimiento (core/shell) en los nanocristales<sup>51</sup>. Se ha empleado ya para determinar la estequiometría y la morfología del nanocristal, y permite penetrar en la estructura más interior del mismo. En todo caso, en dispersiones de nanocristales en medios acuosos su empleo adecuado está limitado en la investigación de los recubrimientos de ligandos orgánicos (empleados para solubilizar los nanomateriales).

El empleo de la espectrofotometría de absorción molecular ultravioleta-visible (**UV-Vis**), concretamente en el caso de los QDs, es una medida indispensable para la caracterización de propiedades ópticas y espectroscópicas y permite estimar la concentración de las nanopartículas de forma sencilla y, de forma simultánea, se puede utilizar para estimar de forma rápida el tamaño de las nanopartículas a través de una fórmula experimental<sup>53</sup>.

Por otro lado la **fluorescencia** de los nanomateriales luminiscentes proporciona información básica sobre la longitud de onda de emisión del máximo, determinada por el tamaño de la nanopartícula, y a su vez en la anchura a la mitad del máximo de emisión se emplea para estimar la distribución de tamaños de las nanopartículas: a menor anchura mayor calidad de las nanopartículas. El rendimiento cuántico de la fluorescencia puede aportar cierta información sobre la presencia de defectos en la superficie.

La espectroscopia de Energía Dispersiva de Rayos-X (**EDX**) se ha empleado para el análisis elemental cualitativo y cuantitativo de las muestras de nanopartículas metálicas. Es una técnica sencilla, rápida, directa y de fácil interpretación para caracterizar la composición, pero posee una resolución espacial limitada y no es efectiva para detectar elementos de bajo número atómico.

Con frecuencia resulta necesario determinar la disposición de los átomos dentro de la estructura cristalina. Con este fin puede emplearse la Difracción de Rayos X (**XRD**) que ha demostrado su utilidad (p. ej. para calcular el espesor del recubrimiento (shell) en el caso de los QDs tipo core-shell). Otra técnica que permite también obtener información sobre la cristalinidad o identificar los defectos estructurales es la Difracción de Electrones (**ED**).

Para caracterización de las propiedades electroquímicas de las nanopartículas, (p. ej. potencial redox y reversibilidad del sistema), se puede emplear la Voltametría Cíclica (**CV**). En todo caso, conviene tener en cuenta que pueden presentarse problemas con las disoluciones de la muestra por la baja solubilidad de las nanopartículas en las disoluciones electrolíticas.

También la Espectroscopia de Fotoelectrones de Rayos X (**XPS**) es una técnica a considerar, aunque, requiere condiciones de ultra-alto vacío. En la caracterización de QDs se ha empleado XPS para su determinación de la composición superficial. Esto ha permitido, en el caso de los QDs CdSe, confirmar la unión de las moléculas de ligandos superficiales (p. ej. trioctilfosfinas) a los átomos de Cd que se encuentran en la superficie de la nanopartícula<sup>54</sup>. La composición del núcleo del nanocrystal, el “shell” en QDs tipo core/shell, el recubrimiento de ligandos, y la oxidación de la superficie<sup>55</sup> se pueden estudiar con esta técnica.

En un intento de calcular la concentración de nanopartículas y estequiometrías (p. ej. en base al número de átomos de Cd medidos dividido por el número de átomos de Cd de un nanocrystal suponiendo que estos son esferas perfectas con la misma densidad del material a escala macroscópica) también se han empleado técnicas atómicas como la espectroscopia de Absorción Atómica (**AAS**) también se han empleado o bien la Espectrometría de Emisión Óptica con fuente de Plasma de Acoplamiento Inductivo (**ICP-OES**) y la Espectrometría de Masas con fuente de Plasma de Acoplamiento Inductivo (**ICP-MS**). El ICP-MS ha demostrado ofrecer una herramienta útil para evaluar con gran precisión la cinética y estequiometrías elementales durante el proceso de la síntesis de la nanopartícula<sup>56</sup>.

Para concluir esta sección conviene mencionar que muchas de estas técnicas son complementarias y se emplean para llevar a cabo la caracterización del nanomaterial en su forma aislada. En la mayoría de las aplicaciones, sin embargo, las nanopartículas se someten a procesos de modificación posterior, para adaptar al material a las necesidades de su aplicación concreta (p. ej. solubilizar en distintos medios o para derivatizar con algún tipo de biomolécula, etc.). En estos casos, además de las técnicas de caracterización que hemos discutido a lo largo de este apartado, puede ser necesario emplear otras diferentes para la caracterización o la purificación en función de la naturaleza química de la muestra que varía con los procesos de modificación, o según las exigencias de la aplicación que se pretende llevar a cabo<sup>49</sup>. Este es un campo en

constante evolución todavía con algunas limitaciones, y por tanto, con importantes retos pendientes, como veremos a lo largo de esta Tesis.

### A.3 SÍNTESIS Y SOLUBILIZACIÓN DE LOS QDS

#### A.3.1 Síntesis de Quantum Dots.

Existen diferentes estrategias para llevar a cabo la síntesis de quantum dots coloidales. Las más habituales son vías de síntesis tipo “*bottom-up*” (*abajo-arriba*)<sup>57,48</sup> por las cuales los quantum dots se obtienen primero como nanopartículas libres en una suspensión coloidal a partir de una serie de precursores que se hacen reaccionar en disolución. También es posible llevar a cabo la síntesis de los QDs siguiendo una vía de síntesis “*top-down*” (*arriba-abajo*) por la cual los quantum dots son fabricados a partir de un sustrato semiconductor laminado, de ahí que las nanopartículas se obtengan incrustadas dentro de una matriz<sup>57</sup>.

Hasta la fecha la mayor parte de las aplicaciones de QDs en bioanálisis hacen uso de nanopartículas “libres” (en suspensión coloidal) y fue esta vía la que elegimos en la presente Tesis Doctoral. La principal ventaja de la síntesis de la nanopartículas libres es que no se requiere instrumentación compleja ni costosa, y es posible fabricar nanocristales de forma controlada a escala industrial a un precio relativamente bajo. Además, desde el punto de vista analítico, las nanopartículas sintetizadas son muy versátiles debido a su potencial para biofuncionalizaciones posteriores<sup>57</sup>.

#### Evolución de la síntesis de QDs coloidales.

La historia de los semiconductores II-VI comienza en 1982 con la publicación de un trabajo donde se presenta por primera vez el espectro de absorción de una disolución coloidal de nanocristales<sup>58</sup> de CdS y, aunque se llevaron a cabo trabajos similares con semiconductores tipo I-VII, fue Brus<sup>59</sup> quien relacionó la absorción con efectos de la mecánica cuántica. Sin embargo, fue en 1993 cuando el trabajo de Murray<sup>60</sup> y col. estableció un hito importante en la síntesis de los nanocristales semiconductores tipo II-VI, concretamente CdS, CdSe y CdTe. Se llevó a cabo el proceso de síntesis de la nanopartícula a partir de la pirolisis de compuestos organometálicos, como el dimetilcadmio y el seleniuro en trioctilfosfina, en un disolvente coordinante a elevada temperatura. La clave de la monodispersidad en esta síntesis está en la separación de las fases de nucleación y crecimiento. A través de la precipitación selectiva se

consiguieron nanocristales cercanos a la monodispersidad que pueden ser disueltos en una amplia variedad de disolventes. Esta síntesis permitió un crecimiento controlado de los nanocristales, y unas nanopartículas de notable calidad (con distribuciones de tamaño de partícula  $< 5\%$ ). Una de las claves del éxito de este trabajo fue la elección del Óxido de Trioctilfosfina (TOPO) como agente coordinante<sup>51</sup>. Posteriormente otros grupos perfeccionaron el procedimiento de síntesis inicial. Así el grupo de Alivisatos<sup>54</sup> consiguió eliminar la necesidad de la precipitación selectiva. En 1998 Peng, Wickham y Alivisatos<sup>61</sup> publicaron un estudio cinético sobre el crecimiento del nanocrystal, sugiriendo que la vía óptima para conseguir nanopartículas monodispersas es ajustar y monitorizar las concentraciones de los monómeros iniciales. Uno de los reactivos empleados en el procedimiento de síntesis propuesto por Murray es el dimetilcadmio ( $(\text{CH}_3)_2\text{Cd}$ ), que es sensible al aire, pirofórico y tóxico, por lo que se exploraron otras vías alternativas. La alternativa propuesta por Peng<sup>62</sup> emplea CdO como precursor (es más sencillo de manipular y menos agresivo con el medio ambiente) y ligandos como ácido hexilfosfónico y TOPO como agentes coordinantes. Con esta modificación no solo se consiguió obtener quantum dots de CdSe de buena calidad, sino que cuando el reactivo de selenio se reemplazaba por Te o S, se obtenían nuevamente nanopartículas de CdTe y CdS de calidad. Otras alternativas al dimetilcadmio fueron el acetato de cadmio<sup>63,64</sup>  $\text{Cd}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2$  o el cloruro de cadmio  $\text{CdCl}_2$ .

Otro paso importante en la evolución de los procesos de síntesis de QDs fue dado por Hines and Guyot-Sionnest<sup>65</sup>, los primeros en sintetizar nanocristales tipo core/shell o núcleo/recubrimiento: CdSe/ZnS con objeto de mejorar las propiedades de las nanopartículas semiconductoras. En este caso, tras llevar a cabo la síntesis del núcleo de nanopartículas de CdSe a partir de los reactivos organometálicos, se añadieron los reactivos para la síntesis de la capa de ZnS, a una temperatura inferior y en varias fases para evitar la nucleación de nanocristales de ZnS. La necesidad de incorporar un nuevo semiconductor que recubra la nanopartícula original surge con el fin de aumentar el bajo rendimiento cuántico obtenido con nanopartículas de CdSe (entre 1 y 15%). La incorporación de un semiconductor adicional recubriendo el núcleo del QD permite minimizar fenómenos de desactivación de la fluorescencia protegiendo los pares electrón hueco en los sitios superficiales<sup>66</sup>, como explicamos con anterioridad.

Más recientemente Dabboussi<sup>55</sup> y col. llevaron a cabo la síntesis de CdSe/ZnS de modo secuencial. Tras llevar a cabo la síntesis de los nanocristales de CdSe, se procedió a su purificación para finalmente realizar la etapa posterior de adición de los

reactivos necesarios para crear la capa de ZnS. Así se logró un incremento de los rendimientos cuánticos de las nanopartículas obtenidas alrededor del 30-50% (1-15% en el caso de CdSe). Peng<sup>67</sup> y col. en 1997 publicaron la síntesis de nanopartículas (core/shell) en dos pasos, aunque en este caso el segundo semiconductor empleado fue el CdS. En este estudio se encontró que el rendimiento cuántico de la fluorescencia se incrementaba en función del espesor de la capa del semiconductor adicional. Otro semiconductor alternativo es el ZnSe<sup>68</sup>, nuevamente depositado sobre núcleos de CdSe, o como capa intermedia para ayudar a la incorporación de ZnS en quantum dots de CdSe/ZnSe/ZnS.

Los QDs con un núcleo de CdSe y los CdSe/ZnS han sido sin duda los más estudiados, y por tanto los empleados de forma mayoritaria en aplicaciones de carácter tanto biológico como analítico<sup>44</sup>.

#### **Proceso general de síntesis de QDs coloidales.**

De forma general el proceso de síntesis de **quantum dots coloidales**<sup>43</sup> consiste en conseguir una mezcla de reacción que contiene todos los compuestos que controlan la nucleación y el crecimiento en forma líquida. Cada una de las especies atómicas que formaran parte del nanocrystal se introduce en la mezcla en forma de un precursor, el cual es una molécula o un complejo que contiene una o más especies atómicas requeridas para el crecimiento de los nanocrystal. Una vez introducidos los precursores estos se descomponen formando nuevas especies reactivas (monómeros) que producirán la nucleación y el crecimiento de la nanopartícula. La energía necesaria para la descomposición de los precursores es proporcionada por el líquido del reactor, bien por colisión térmica o por una reacción química entre el precursor y el medio líquido (o por combinación de ambos mecanismos).

El punto clave de la síntesis es la presencia de una o más moléculas que actúen como agentes coordinantes que se adsorben de forma dinámica sobre la superficie del QD en crecimiento bajo las condiciones de reacción. Los agentes coordinantes deben ser lo suficientemente móviles como para permitir el acceso de más unidades de monómero, y lo suficientemente estables para prevenir la agregación de los nanocrystal. La elección de un agente coordinante varía de un caso a otro: si se une con demasiada fuerza a la superficie del quantum dot no es adecuado porque impedirá el crecimiento del nanocrystal. Sin embargo si este agente coordinante se une de forma débil obtendremos nanopartículas con un gran tamaño o agregados. Ejemplos de coordinantes adecuados incluyen: alquiltioles, óxidos de fosfina, fosfatos, fosfonatos,

amidas o aminas, ácidos carboxílicos y compuestos aromáticos que contienen nitrógeno. Si el crecimiento del nanocrystal se lleva a cabo a temperaturas elevadas, la molécula coordinante debe ser estable en esas condiciones para poder controlar el crecimiento. Al disminuir la temperatura, se interrumpe el crecimiento de la nanopartícula, y la molécula coordinante se une con más fuerza a la superficie del nanocrystal determinando así la solubilidad en unos determinados disolventes u otros. Este recubrimiento con la molécula coordinante proporciona una gran flexibilidad química: puede ser intercambiado con otro recubrimiento de moléculas orgánicas con diferente funcionalidad o polaridad, o puede ser eliminada esta capa y permitir el crecimiento de una segunda capa de material con propiedades eléctricas, ópticas o magnéticas sobre el nanocrystal inicial.

Durante el proceso de síntesis se puede ejercer un control sobre el tamaño y/o la forma del nanocrystal<sup>51</sup> controlando la proporción de moléculas coordinantes, el volumen de inyección, la concentración de monómero, o el tiempo de reacción. De este modo es posible obtener nanopartículas esféricas, nanorods (forma barra) o tetrapods (forma tetraedros) de diferentes tamaños según el tipo de aplicación requerido.

Este proceso de síntesis asegura la obtención de nanopartículas monodispersas y estables, pero para que tengan utilidad analítica los quantum dots deben ser estables y solubles en el medio líquido de interés. En caso de aplicaciones analíticas es de resaltar aquí que dicho medio suele ser mayoritariamente un medio acuoso.

### **A.3.2 Estrategias de solubilización de los quantum dots.**

Existen vías de síntesis de QDs (fundamentalmente de CdTe<sup>69</sup>) que proporcionan partículas directamente solubles en medios acuosos<sup>70</sup>, evitando de esta forma que sea necesaria una etapa posterior de modificación para transferir las nanopartículas sintetizadas en un medio orgánico a un medio acuoso. No obstante, los quantum dots de mayor calidad se obtienen mediante síntesis a elevada temperatura empleando agentes coordinantes en medio orgánico, como hemos descrito anteriormente. De ahí surge la necesidad de desarrollar procedimientos de solubilización de los QDs que permitan que las nanopartículas sintetizadas en medio orgánico puedan ser empleadas en aplicaciones biológicas (medios acuosos).

El diseño de recubrimientos hidrofílicos robustos y versátiles de nanopartículas, ha sido un caballo de batalla abordado por numerosos investigadores durante los últimos años. El gran objetivo no es ya conseguir la solubilidad en medios acuosos,

sino ofrecer la posibilidad de incorporar determinados grupos funcionales a la superficie del nanocrystal que permitan en último término establecer uniones (covalentes, electrostáticas, etc.) con una molécula o biomolécula de interés mediante reacciones de derivatización (bioconjugaciones). Un recubrimiento ideal<sup>44</sup> para los quantum dots debería incluir:

- elevada afinidad por la superficie del quantum dots.
- estabilidad coloidal a largo plazo en un amplio rango de pH y fuerza iónica.
- capacidad de bioconjugación.
- minimizar el tamaño hidrodinámico de la nanopartícula final.
- biocompatibilidad (no tóxico ni inmunogénico) con reducidas uniones inespecíficas.

Si la finalidad de los QDs es emplearlos como marcadores biológicos<sup>71</sup>, además deberemos tener en cuenta que dicho marcador presente bajas uniones inespecíficas a los tejidos biológicos, tenga resistencia a ser eliminados por macrófagos y que posea un elevado rendimiento cuántico y tiempos de vida estables.

El QDs ya solubilizado debe presentar una estructura versátil que posibilite su bioconjugación, una baja citotoxicidad y tiempos de retención in vivo limitados. Es muy difícil conseguir que se cumpla cada uno de estos requisitos (tanto para conseguir un buen recubrimiento como un marcador biológico final estable). Así durante los últimos diez años se han llevado a cabo numerosos trabajos con objeto de mejorar la química superficial de los QDs, y otros nanomateriales. Las estrategias desarrolladas para transferir las nanopartículas a medio acuoso se pueden agrupar en tres categorías principales:

- 1) **Intercambio de ligandos** hidrofóbicos por ligandos hidrofílicos.
- 2) **Silanización.**
- 3) **Encapsulación**, que implica el recubrimiento de los ligandos hidrofílicos con un polímero anfifílico (similar a una estructura micelar).

El recubrimiento empleado para llevar a cabo la solubilización puede influir en la estabilidad final de la nanopartícula, en las uniones entre la nanopartícula previamente bioconjugadas y otras biomoléculas, en el tamaño final del nanomaterial y concretamente en el caso de los QDs sobre el rendimiento cuántico.



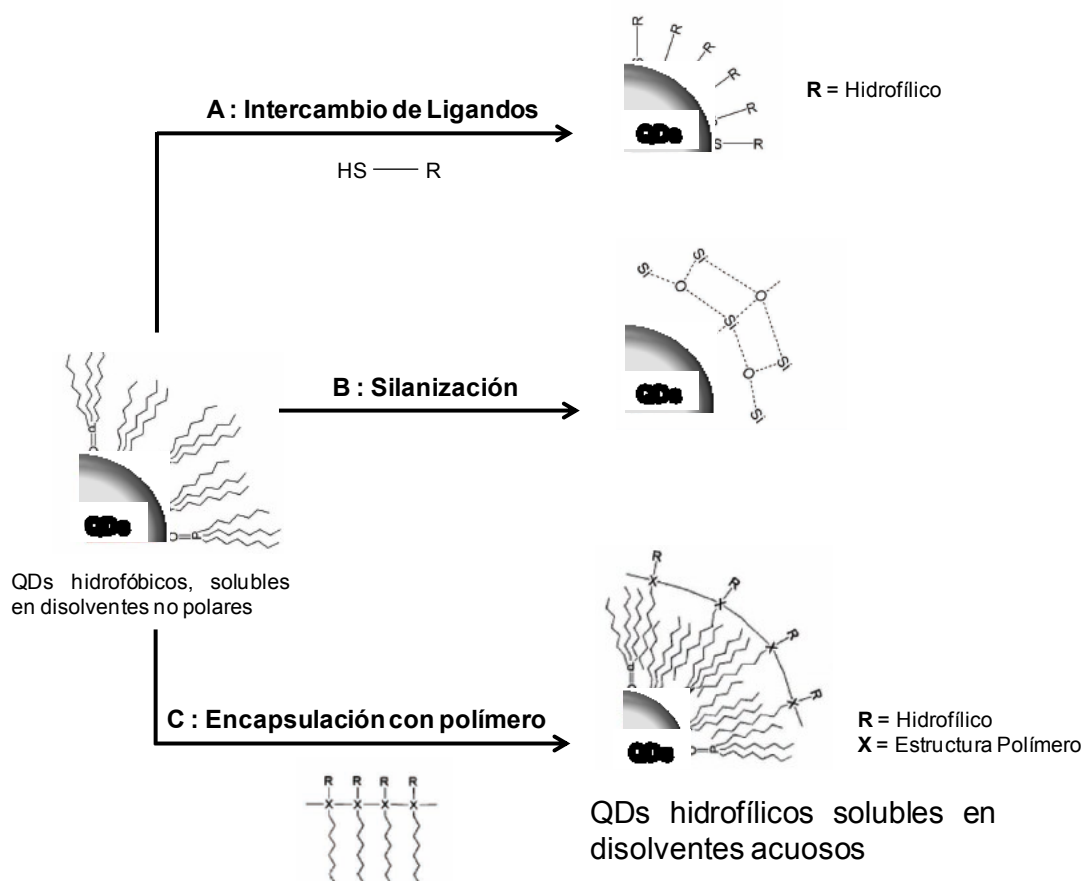


Figura 11. Estrategias de solubilización de los QDs en medios acuosos<sup>72,71</sup>.

### A.3.2.1 Intercambio de ligandos

Consiste en reemplazar las moléculas hidrofóbicas o agentes coordinantes (generalmente TOP, TOPO) que recubren la superficie de la nanopartícula después de su síntesis en medio orgánico, por otras moléculas bifuncionales, las cuales poseen normalmente un grupo tiol (-SH) en uno de sus extremos. Esta estrategia es conocida desde hace tiempo en el caso de nanopartículas de oro, y es bastante sencilla de aplicar. En el caso de QDs a base de calcogenuros de Cd, Zn o Pb, los grupos tiol presentan una gran fuerza de unión con la superficie, debido a la gran componente covalente del enlace metal-tiol. El otro extremo de la molécula bifuncional tiene un grupo funcional polar, el cual proporcionará solubilidad a la nanopartícula. Chan<sup>73</sup> y col. fueron pioneros en emplear esta estrategia, utilizando ácido mercaptoacético (MAA) como ligando bifuncional. Trabajando al pH adecuado para cada grupo funcional (e. j. pH básico para el grupo carboxílico), el grupo polar se encuentra desprotonado de modo que la carga negativa que envuelve ahora al QD provocará la repulsión electrostática

entre las nanopartículas evitando la agregación de las mismas<sup>74</sup>. El problema surge del hecho de que este tipo de QDs poseen baja estabilidad en disoluciones de elevada fuerza iónica. Además, con el tiempo tiene lugar la desorción gradual de estos ligandos bifuncionales, conduciendo a la agregación y precipitación de los QDs. Otra complicación general de esta estrategia es que para cada tipo de nanopartícula son necesarios ligandos con diferentes grupos de unión.

Los ligandos se disocian de la superficie del QD debido a la naturaleza dinámica del enlace semiconductor-tiol<sup>75</sup>, por lo que es necesario un exceso del ligando bifuncional libre, lo cual puede ser un aspecto limitante en el caso de ligandos “*a medida*”. Otro factor que contribuye a la pobre estabilidad coloidal de los QDs modificados con ligandos bidentados radica en la estabilización electrostática (dada por la ionización de los grupos terminales). Este hecho limita la región de estabilidad coloidal a pH alcalinos, y con baja fuerza iónica, en el caso de ligandos con grupos carboxilo. El empleo de derivados de polietilenglicol supera algunas de las limitaciones de los ligandos carboxilo, ya que en este caso la estabilización tiene lugar a través de enlaces hidrógeno e interacciones estéricas.

Con objeto de mejorar la estabilidad a largo plazo, Mattoussi<sup>76</sup> y col. decidieron emplear ácido dihidrolipoico (DHHLA), una molécula bifuncional pero a su vez posee dos grupos tiol, con objeto de establecer una unión más fuerte con la nanopartícula. A la molécula de DHHLA se le añadió un apéndice de polietilenglicol (PEG) para hacer al QD más biocompatible y menos sensible a la fuerza iónica. Después del éxito inicial de esta estrategia para recubrir CdSe/ZnS a partir de DHHLA con PEG, se emplearon otros derivados con grupos funcionales diferentes. El desarrollo de esta vía ha permitido obtener quantum dots con una solubilidad en medio acuoso casi universal<sup>77</sup> en todo el intervalo de pHs, y a fuerzas iónicas muy elevadas (hasta 2M).

A pesar de estos buenos resultados no debemos olvidar que una de las características de un recubrimiento ideal sería reducir el tamaño hidrodinámico del quantum dot. Por ello han comenzado a emplearse ligandos “*zwitterionic*” como alternativas<sup>78</sup> a los ligandos de PEG porque presentan las mismas ventajas pero proporcionan dimensiones hidrodinámicas más pequeñas. Otra opción que se ha propuesto son los ligandos “*dendron*” que son, moléculas orgánicas con un punto central con grupos tiol, amino o carboxilo<sup>79</sup> que propician la unión con la superficie de la nanopartícula y están regularmente ramificados. El hacinamiento de los ligandos proporcionado por los dendrones permite la formación de una capa compacta en torno

a las nanopartículas pero no de espesor elevado. El denso empaquetado minimiza la difusión de pequeñas moléculas hacia la superficie, mejorando su estabilidad fotoquímica. Por desgracia, su síntesis no es trivial.

Un inconveniente relacionado con su aplicación final es el alto grado de interacciones electrostáticas inespecíficas con proteínas, anticuerpos o superficies celulares. Nuevamente los QDs derivatizados con PEG minimizan las uniones inespecíficas, reducen la toxicidad celular e incrementan los tiempos de circulación in vivo<sup>80</sup>. Dadas las buenas propiedades de PEG cada vez es más habitual que se incorporen segmentos de este material a la superficie de la nanopartícula para hacerla más biocompatible.

Otras alternativas descritas, menos utilizadas, hacen uso de péptidos<sup>81</sup> con un dominio hidrofóbico y otro hidrofílico o fosfinas oligoméricas<sup>82</sup> como ligandos para recubrir la superficie. Problemas derivados de costo o necesidades de complejos procesos de purificación han limitado el uso de estas alternativas.

En resumen, la principal ventaja de esta vía de intercambio de ligandos es que se obtienen QDs solubles en medio acuoso con un pequeño diámetro hidrodinámico. Aunque persisten inconvenientes como la limitada estabilidad coloidal y reducido rendimiento cuántico. La propia naturaleza del recubrimiento de ligandos expone la superficie del nanomaterial a oxígeno o agua que puede reducir su luminiscencia. Además, la síntesis de la mayoría de los ligandos es complicada y costosa, lo que supone un límite en la elección de esta ruta (como hemos mencionado se requiere un exceso de ligando para que el proceso tenga lugar). Hoy por hoy el mejor ligando para cada tipo de nanomaterial debe ser elegido por medio de laboriosas optimizaciones empíricas<sup>71</sup>.

### **A.3.2.2 Silanización**

Este proceso no deja de ser una variante de la vía de intercambio de ligando en la que tiene lugar el entrecruzamiento de los mismos para formar la capa. Consiste básicamente en hacer crecer una capa de sílice sobre la superficie de la nanopartícula<sup>83</sup>. El primer paso para llevar a cabo la silanización implica el intercambio de ligandos hidrofóbicos por moléculas como mercaptopropiltris(metiloxi)silano (MPS) o aminopropil(trimetiloxi)silano (APS) para construir una primera capa a partir de los precursores, a través de enlaces tiol a la superficie de la nanopartícula. El grupo terminal de unión del precursor de sílice se debe seleccionar de forma individual para

cada material para que la unión sea lo suficientemente fuerte. El recubrimiento de sílice puede crecer sobre las nanopartículas recubiertas con silano empleando silicatos de sodio o tetraetoxisilano en alcohol. Otra aproximación supone entrecruzar la capa inicial de silanos entre sí para construir una capa densa de siloxanos. Se pueden incorporar silanos secundarios con grupos ionizables hidrofílicos para añadir carácter hidrofílico al recubrimiento e incorporar funcionalidad química, permitiendo incorporar p. ej. cadenas de PEG.

Este tipo de recubrimiento es lo suficientemente compacto para ser resistente a la desorción, y proporcionar a las nanopartículas una mayor fotoestabilidad<sup>84,85</sup> protegiéndolas del entorno. Sin embargo, esta vía no está exenta de problemas ya que es difícil obtener capas homogéneas<sup>86</sup> de sílice con espesor inferior a 5 nm, y además pueden aparecer problemas de agregación. El control del proceso de la deposición de sílice sobre la nanopartícula es bastante complejo por lo que se siguen desarrollando protocolos buscando un recubrimiento uniforme.

### **A.3.2.3 Interacción hidrofóbica con polímero anfifílico**

Esta estrategia consiste en intercalar una serie de cadenas hidrofóbicas de un polímero anfifílico con las cadenas carbonadas que rodean a la nanopartícula. Mediante interacciones hidrofóbicas<sup>87,88</sup> tiene lugar la unión con los grupos nativos del QD, mientras que las especies cargadas (p. ej. los grupos carboxilo, amino o segmentos de PEG que constituyen la parte hidrofílica del polímero) confieren la solubilidad a la nanopartícula. De esta forma los grupos hidrofílicos del polímero se orientarán hacia el exterior (medio que rodea a la nanopartícula), y al igual que en los casos anteriores son lo que proporcionarán la solubilidad en medio acuoso. En el polímero anfifílico una sola cadena de polímero posee numerosas cadenas hidrofóbicas, por lo que la unión con el QD está favorecida por los numerosos puntos de contacto entre las cadenas hidrofóbicas.

El hecho de conservar los agentes coordinantes originales durante el proceso de modificación hace que los QDs sean más estables que los obtenidos mediante la vía de intercambio de ligandos<sup>44</sup>. Esta modificación, menos agresiva, provoca menores cambios del rendimiento cuántico de los QDs (p. ej. apenas hay interacciones con la superficie de la nanopartícula).

Los primeros intentos de llevar a cabo dicho procedimiento fueron fruto del trabajo de Dubertret<sup>89</sup> y col., quienes emplearon micelas de polímeros a partir de

fosfolípidos. Sin embargo, los QDs resultantes mostraban una baja estabilidad coloidal por el escaso anclaje de dichos QDs. Recientemente se ha contemplado la posibilidad de utilizar ácidos grasos sobre los fosfolípidos para generar bicapas<sup>90</sup>. Casi simultáneamente en el tiempo, Bruchez<sup>91</sup> y col. usaron un polímero a base de ácido poliacrílico y consiguieron solubilizar también los QDs. El polímero estaba constituido utilizando como base el ácido poliacrílico, con apéndices de cadenas alquílicas, convirtiendo el 40% de los grupos carboxílicos del esqueleto del polímero en amidas hidrofóbicas con octilamina. Estas cadenas hidrofóbicas son las que interaccionan con los ligandos TOP/TOPO de la superficie del QD mientras los grupos ácidos que permanecen libres mantienen a la nanopartícula cargada negativamente. La gran ventaja es que un amplio rango de nanopartículas, en principio, pueden transferirse a medio acuoso con un polímero anfifílico óptimo.

Otros polímeros anfifílicos similares han sido sintetizados empleando como base anhídrido maleico con aminas primarias<sup>87</sup>, y empleando bis(6-aminoheptil)amina como entrecruzador de los polímeros alrededor de la nanopartícula. Este tipo de nanomateriales presentan una buena estabilidad coloidal (debido a la disociación limitada de polímero de la superficie del QD) pero como la estabilización se alcanza por interacciones electrostáticas en disoluciones de elevada concentración de electrolitos dicha estabilización está comprometida. Para superar este escollo, se puede funcionalizar el QD con cadenas de PEG para proporcionarle una mayor estabilidad coloidal y biocompatibilidad, obteniéndose los mayores rendimientos cuánticos encontrados para QDs en disoluciones acuosas<sup>92</sup>. Un inconveniente en el empleo de estos polímeros es su elevado peso molecular, los cuales incrementan notablemente el diámetro hidrodinámico<sup>93</sup> de la nanopartícula, además del hecho de conservar la capa nativa de ligandos de la nanopartícula. Por todo ello, una alternativa está en usar polímeros disponibles comercialmente, p. ej. anhídrido maleico-poliestireno evitando el empleo del entrecruzador<sup>94</sup>.

Sin embargo, otros trabajos han intentado sustituir las cadenas hidrofóbicas por grupos coordinantes como imidazol o ditioles<sup>95</sup>. Podríamos considerar este método como una combinación de la vía de intercambio de ligandos (coordinación directa con la superficie del QD), con la diversidad proporcionada por las unidades discretas de polímero anfifílico.

La eficacia de un QD en cualquier aplicación biológica depende de las propiedades del recubrimiento, por lo que se sigue avanzando en la búsqueda de

nuevas vías de solubilización y en el perfeccionamiento de las ya existentes. Sin duda este es un campo en continuo desarrollo, aunque existan ya técnicas de solubilización lo suficientemente desarrolladas. Un recubrimiento “ideal”<sup>96</sup> debería evitar que los QDs se agreguen durante periodos de almacenamiento largos, mantener el rendimiento cuántico de la fluorescencia y mantener el tamaño global del QD por debajo de los 10 nm. Desgraciadamente, como hemos visto, las estrategias disponibles hasta el momento en ningún caso cumplen todos los requisitos a la vez.

### A.3.3 Inmovilización de los Quantum Dots.

A pesar de que en muchas aplicaciones los quantum dots se emplean en forma de dispersión coloidal, si se pretende dar un paso hacia el desarrollo de sensores es necesario llevar a cabo su inmovilización sobre un soporte sólido adecuado para fabricar fases sólidas activas. En un soporte ideal para la inmovilización de las nanopartículas están deben ser retenidas (evitar lixiviado), pero siempre manteniendo sus propiedades ópticas.

Se han empleado distintos materiales sólidos como polímeros, vidrios y sol-geles para la producción de materiales sólidos dopados con quantum dots, pero en muchos casos se basa en el propio crecimiento de la nanopartícula en el interior del material o en la precipitación en el interior de un medio estructurado<sup>97</sup>. Sin embargo el crecimiento *in situ* no permite un control sobre las características superficiales de la nanopartícula: estados superficiales, forma, pasivación, etc. Otro inconveniente de la preparación directa de los nanomateriales en el soporte sólido, es que en el caso de estructuras un tanto más complejas como nanorods o tipo núcleo-recubrimiento el proceso de síntesis se hace demasiado complicado, y no pueden ser sintetizadas<sup>98</sup>. Además, como ya hemos mencionado anteriormente en las estrategias de solubilización los nanocristales, estos son sensibles a cualquier cambio en el entorno, por lo que la transferencia de los nanocristales al interior de cualquiera de estos materiales soporte no es tan sencilla. No son habituales los trabajos donde se incorpora eficazmente en un medio estructurado QDs procedentes de síntesis coloidales.

La inmovilización de los quantum dots puede proporcionarnos ventajas a la hora de desarrollar bioensayos o biosensores<sup>99</sup>. Se puede sustituir una etapa de purificación por un simple lavado para eliminar el exceso de los biomateriales; los requisitos de solubilidad y estabilización son menos estrictos, por lo que las nanopartículas pueden ser más flexibles; una mayor selección de recubrimientos,

químicas de enlace y disolventes pueden emplearse para el ensamblaje de los quantum dots en los sensores. Finalmente, también puede reportar alguna ventaja en la detección una vez la fase sensora se ha puesto en contacto con la muestra el simple lavado de la misma que puede eliminar parte de la señal de fondo (además de potenciar la reutilización o regeneración, una característica muy valorada en el desarrollo de cualquier sensor).

Los procedimientos de inmovilización de fases activas descritos hasta la fecha tienen lugar mediante atrapamiento físico, unión covalente, enlaces dativos/coordinados, interacciones electrostáticas o de afinidad, o por combinación de varios de estos mecanismos. Cualquiera que sea el método escogido para llevar a cabo la inmovilización debe tener en cuenta los medios de bioconjugación, la proximidad requerida entre los quantum dots y el medio de reconocimiento, así como el tamaño y movilidad del analito. En algunas aplicaciones la estabilidad de la inmovilización y la densidad de quantum dots en la interfase pueden ser importantes. Así, la mayoría de los bioensayos y biosensores para ácidos nucleicos o proteínas requieren la inmovilización de la nanopartícula como láminas en un sustrato, en lugar de una red tridimensional.

Se han llevado a cabo intentos de incorporar nanocristales semiconductores coloidales en polímeros: mezclando los dos materiales ya formados o bien mediante la polimerización en presencia de los nanocristales. Los mejores resultados se obtienen en el segundo caso, ya que los QDs hidrofóbicos presentan mejor compatibilidad con los monómeros. La elección apropiada de los monómeros es crucial, ya que durante el transcurso de la polimerización puede tener lugar una separación de las fases que conduzca a la agregación de las nanopartículas con la consiguiente reducción en la transparencia del material. Bawendi<sup>100</sup> y col. han tenido éxito en la fabricación de un polímero transparente que contiene CdSe/ZnS, con escasa deterioro de las propiedades ópticas de los quantum dots a través de la polimerización de polilaurilmetacrilato, el cual se empleó con éxito en el desarrollo de un prototipo de LED<sup>101</sup> (Light Emitting Diode).

Tradicionalmente los materiales tipo sol-gel han demostrado ser especialmente adecuados para el desarrollo de sensores ópticos luminiscentes mediante el atrapamiento de la molécula indicadora dentro de la estructura inorgánica durante el proceso de polimerización del sol-gel<sup>102</sup>. Este tipo de materiales ofrecen nuevas e interesantes posibilidades para la encapsulación de moléculas frágiles y térmicamente

sensibles tales como: enzimas, proteínas y anticuerpos<sup>103</sup>. Sin embargo, estos materiales no están exentos de inconvenientes, por ejemplo, un cambio en la polaridad o reacciones sobre la superficie de los quantum dots durante el proceso sol-gel, podrían tener como resultado una indeseable reducción de la fluorescencia.

Para superar dichas limitaciones, existen vías alternativas como el uso de alquilaminas como precursores bifuncionales que ayuden en este tipo de síntesis, actuando como estabilizadores<sup>98</sup>. Otra alternativa es el secado con dióxido de carbono supercrítico, que permite obtener aerogeles con estructuras sensibles al a funcionalización altamente porosas.

Este tipo de materiales inorgánicos sol-gel dopados con quantum dots han demostrado poseer una elevada estabilidad y resistencia a la degradación, pero ha sido principalmente en aplicaciones optoelectrónicas (como medios activos en láseres sintonizables o en placas solares). Sin embargo, si consideramos la variedad de aplicaciones tanto químicas como biológicas que hacen uso de materiales de tipo sol-gel empleando como fluoróforos colorantes orgánicos, la implementación de este tipo de materiales junto con los QDs en el desarrollo de sensores bioquímicos sería realista.

#### **A.3.4 Aplicaciones bioanalíticas de los quantum dots.**

La inmensa mayoría de las aplicaciones bioanalíticas descritas hasta la fecha, que hacen uso de los QDs como “marcas” luminiscentes requiere la conjugación previa de la nanopartícula con una determinada biomolécula, o bien con una molécula “puente” para propiciar la bioconjugación posterior. Hasta el momento los métodos que se han empleado para establecer esta unión se basan en los métodos tradicionales de marcaje de proteínas. Así, es frecuente el establecimiento de enlaces por medio de los grupos amino, ácido, o tioles, o bien a través de la química de la carbodiimida, succinimidil esteres o maledeimida. Sin embargo, a pesar de ser estos procesos ya muy controlados, cuando se trabaja con nanopartículas pueden aparecer problemas de agregación (por entrecruzamiento) o valencias múltiples (diferente número de biomoléculas por nanopartícula), e incluso una pérdida de actividad biológica de la biomolécula.

Idealmente en todos los procesos de bioconjugación<sup>104</sup> debería existir un control sobre:

-el número de biomoléculas por QD (valencia del conjugado) importante a la hora de interpretar los fenómenos de reconocimiento a nivel celular



-la orientación y aspecto clave durante los procesos de unión de la biomolécula o de catálisis.

-posición de la biomolécula sobre el QD esencial en el desarrollo de aplicaciones tipo FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) o de transferencia de carga (CT).

-la estabilidad del conjugado final parámetro esencial en el caso de aplicaciones que impliquen el empleo del bioconjugado final durante periodos de tiempo relativamente largos.

-la retención de la actividad biológica.

-la reproducibilidad del proceso.

Una alternativa de conjugación que parece que proporciona unos buenos resultados en términos de control de la bioconjugación es hacer uso de la interacción biotina-avidina, o a través de biomoléculas marcadas con polihistidinas. Conseguir una conjugación favorable cumpliendo los requisitos que hemos mencionado anteriormente es hoy en día todavía uno de los mayores obstáculos para alcanzar avances en bioanálisis mediante empleo de QDs<sup>44</sup>.

En el estudio de procesos celulares<sup>41</sup> el empleo de los quantum dots como marcadores puede permitir solucionar problemas como la pérdida de luminiscencia con el tiempo de exposición (photobleaching) o la falta de luminosidad de los fluoróforos moleculares tradicionales cuando se trabaja con microscopia de fluorescencia, mejorando así la resolución espacial y el proceso de seguimiento de los eventos en la célula a nivel molecular.

Las primeras aplicaciones biomédicas desarrolladas empleando QDs fueron desarrolladas por Bruchez y col.<sup>83</sup>, y casi de forma simultánea por Chan<sup>73</sup> y col. En el primer caso se emplearon QDs de dos colores diferentes recubiertos de una capa de sílice: rojos modificados con biotina para visualizar los filamentos de F-actina, y verdes modificados con trimetoxisilil propil urea con afinidad por el núcleo celular en las células. En el segundo caso los QDs se modificaron con ácido mercaptoacético para estudiar la absorción de la proteína transferrina por células tipo HeLa. Ambos trabajos constituyen un hito esencial en el desarrollo y empleo de los QDs para aplicaciones biomédicas ya que describen, por primera vez, la posibilidad de sintetizar QDs biocompatibles y con capacidad de bioconjugación.

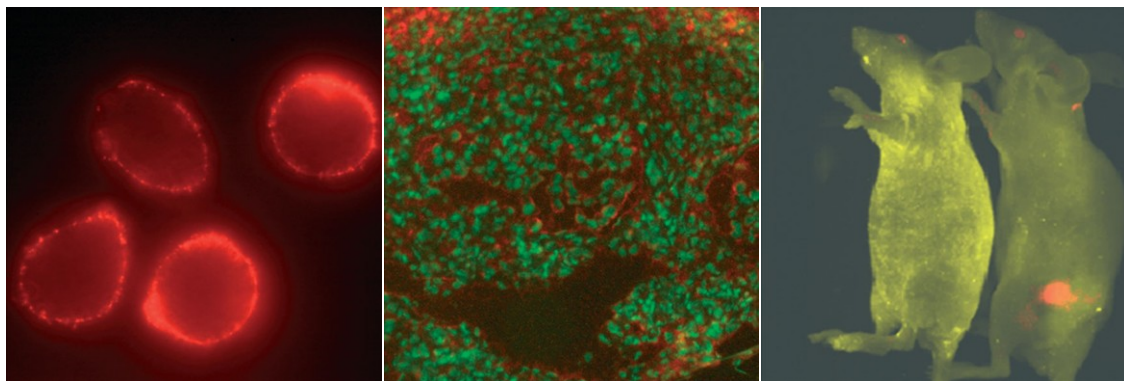
Desde estos trabajos pioneros los QDs<sup>72,105,106</sup> han sido empleados como marcadores en el seguimiento de proteínas en la superficie celular o en los orgánulos

intracelulares o en el estudio de procesos de transducción, transporte y en la localización de las funciones específicas de una molécula en tiempo real.

La elevada estabilidad de la emisión fluorescente de los QDs hace posible llevar a cabo la toma de imágenes *in vivo* de componentes celulares marcados con estas nanopartículas con una gran resolución, selectividad y precisión. En el caso de estudios dinámicos, estos nuevos marcadores permiten un mayor tiempo de observación frente a otros marcadores convencionales que debido a que experimentan problemas de fotodescomposición obligarían a acortar el tiempo de análisis<sup>107</sup>.

Un campo en el que se está haciendo un gran esfuerzo investigador empleando QDs como materiales luminiscentes indicadores es en el diagnóstico del cáncer. Los medios existentes para el diagnóstico de cáncer están limitados a la detección de tumores relativamente grandes (0,5-1 cm) e implican el empleo de técnicas invasivas, como biopsias. Sería de gran utilidad tener herramientas que permitiesen el diagnóstico en una etapa más temprana. Además, existe la necesidad de encontrar biomarcadores específicos de cáncer sensibles que permitan desarrollar análisis de cribado. En este contexto, los QDs se están investigando como marcadores en el desarrollo de metodologías luminiscentes para análisis de marcadores tumorales en fluidos biológicos o en la toma de imágenes médicas de tumores<sup>108</sup>.

Los elevados rendimientos fluorescentes de los QDs justifican su empleo en el estudio de tejidos a profundidad. Además los QDs pueden servir como sondas sensibles para la detección de varios marcadores tumorales simultáneamente por su capacidad multianalito ("multiplexed labelling") gracias a su amplio rango de emisión luminiscente modulable. No obstante, existen otros retos a superar como la propia autofluorescencia de los tejidos que puede enmascarar la fluorescencia de los QDs, la estabilidad del conjunto de la nanopartícula tiene que ser optimizada para asegurar la biocompatibilidad. En este contexto, los QDs que emiten en la región del infrarrojo son de especial utilidad cuando se quieren evitar problemas de autofluorescencia de los propios tejidos. Se evitan ruidos de interferencias del tejido del propio animal.



**Figura 12.** Imágenes de fluorescencia de QDs como marcadores en células cancerosas, en una sección de un tejido<sup>109</sup> e in vivo en un tumor prostático<sup>110</sup> en una rata.

A pesar de las mejores características de los quantum dots frente a los fluoróforos convencionales<sup>111</sup>, la simple sustitución de los colorantes convencionales como marcadores en bioanálisis<sup>112</sup> en áreas como investigación farmacéutica, diagnóstico de enfermedades o contraste de imágenes, no es la única vía de aplicación de los QDs en bioanálisis. Su empleo como marcadores en ensayos múltiples o multianalito (detección de más de un analito de interés de forma simultánea) parece más ventajosa, dado que las propiedades ópticas de las nanopartículas pueden simplificar el proceso de análisis y su implementación<sup>113</sup>. La posibilidad de excitar varios quantum dots de diferente emisión (tamaño) empleando una única fuente de excitación, además del empleo simultáneo de varios QDs como marcas durante un bioensayo multianalito, se puede realizar de forma mecanizada y miniaturizada, si los QDs se integran dentro de plataformas de diagnóstico<sup>114</sup>, sustituyendo la detección espacial en diferentes canales por la detección óptica simultánea.

Otra vía alternativa de bioanálisis en donde se han empleado QDs luminiscentes es a través de “*QDs barcodes*”: QDs de diferentes colores se combinan en una estructura, por ejemplo una microesfera, para generar un “*código de barras óptico*”. Si se emplean seis quantum dots de emisión diferente y diez niveles de intensidad se pueden obtener teóricamente alrededor de diez millones de códigos<sup>72</sup>. Estas micropartículas se emplean posteriormente para conjugarlas con las biomoléculas permitiendo la identificación o cribado de varias biomoléculas en muestras biológicas. Recientemente se han empleado estos barcodes para detectar los fragmentos genéticos de patógenos de VIH, malaria, hepatitis B y C, y sífilis en menos de diez minutos de forma simultánea<sup>115</sup>.

El desarrollo de sensores desechables de monitorización continua constituye un nuevo reto en la evolución de las aplicaciones biomédicas de los QDs. La investigación en este sentido ha estado orientada hacia la inmovilización de los quantum dots sobre una interfase, pero al mismo tiempo permaneciendo accesible para posteriores bioconjugaciones o uniones biomoleculares. A través de biomoléculas tales como proteínas, péptidos y oligonucleótidos se consigue la inmovilización, y se puede partir así de esta base para desarrollar sensores basados en mecanismos tipo FRET o bien de reconocimiento directo del analito. Si este tipo de biosensores inmovilizados se utiliza en combinación con dispositivos tipo "lab-on-a-chip", se conseguirá explotar las ventajas de la detección multianalito junto con las ventajas del manejo automatizado que presentan este tipo de dispositivo.

La Figura 13 recoge de modo esquemático las aplicaciones más comunes de los QDs para bioanálisis.

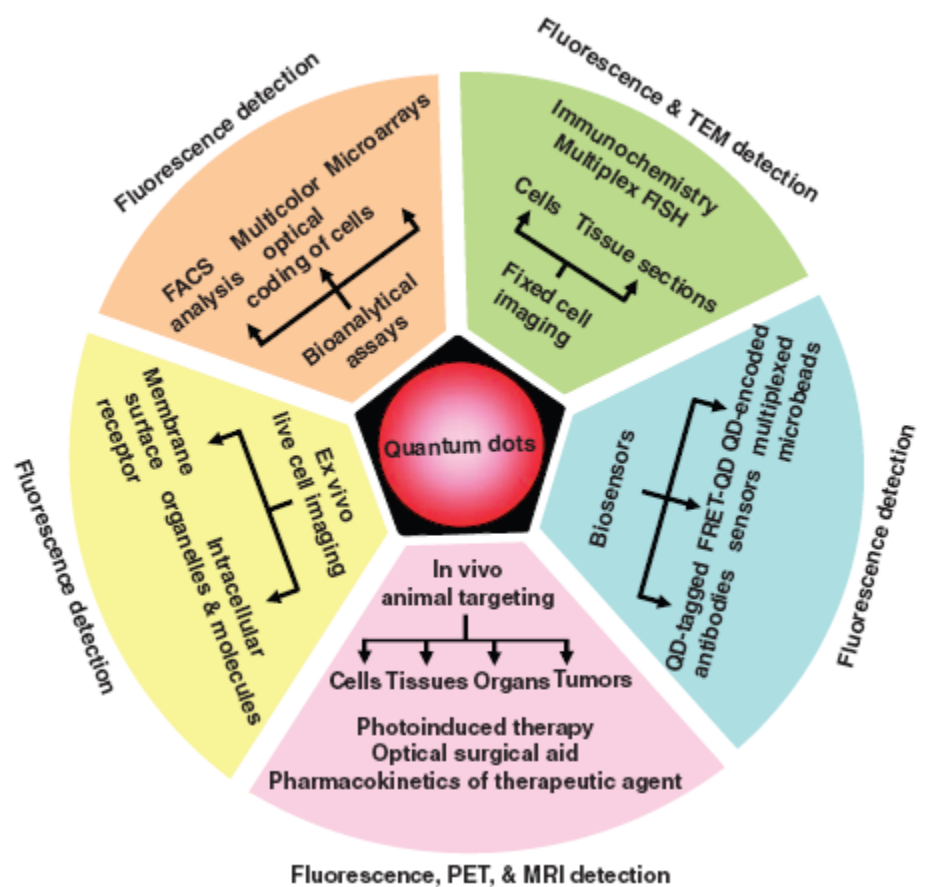


Figura 13. Aplicaciones de los quantum dots<sup>41</sup>.

## **A.4 APLICACIONES ANALÍTICAS DE LOS QDS BASADAS EN LA MEDIDA DE SUS PROPIEDADES LUMINISCENTES: SENSORES BASADOS EN QUANTUM DOTS.**

Como ya se ha detallado anteriormente, los QDs poseen unas excelentes propiedades ópticas. Además su superficie ofrece una amplia versatilidad desde el punto de vista bioquímico, ya que puede ser modificada con diferentes biomoléculas (anticuerpos, proteínas, aptámeros). Todo ello hace de los QDs un tipo de materiales luminiscentes especialmente atractivo como marcadores en el desarrollo de novedosas aplicaciones analíticas. Sin embargo, a pesar del rápido desarrollo de las aplicaciones de los QDs en *bioimaging* (toma de imágenes) y medicina, sus aplicaciones como indicadores en análisis químico han tenido un desarrollo mucho más reciente y menos extenso.

Los QDs se han empleado en el desarrollo de nuevas metodologías analíticas como elemento “*activos*” en sensores, como marcadores “*pasivos/indirectos*”, o bien como donadores en el desarrollo de metodologías luminiscentes basadas en fluorescencia con transferencia de energía (FRET).

### **A.4.1 Metodologías analíticas basadas en la interacción directa del analito con el QD**

La luminiscencia de los QDs es muy sensible al estado de su superficie, por lo que es razonable pensar que cualquier interacción física y química entre una especie química y el entorno que rodea a la nanopartícula, podría provocar cambios en la eficiencia de la recombinación del par hueco-electrón. En este tipo de metodologías las propiedades fluorescentes de la nanopartícula varían por la reacción con un determinado analito. Se ha empleado esta estrategia con éxito en la detección de pequeñas moléculas e iones<sup>39</sup> empleando QDs de diferente naturaleza. En uno de los trabajos pioneros que emplean esta metodología, se mostraba un incremento en la emisión de luminiscencia de QD CdS en presencia de Cd<sup>2+</sup> atribuido a la formación de Cd(OH)<sub>2</sub> sobre la superficie de la nanopartícula, eliminándose así la recombinación no radiacional de los canales de carga<sup>116</sup>. Efectos similares se observaron al añadir bien Zn<sup>2+</sup> o Cu<sup>2+</sup> simplemente variando el ligando que recubre la nanopartícula de CdS<sup>117</sup>, o al añadir Ag<sup>+</sup> sobre nanopartículas de CdS modificadas con L-cisteína<sup>118</sup>. La mayoría

de las aplicaciones analíticas propuestas que utilizan QDs como indicadores directos están basadas en las medidas de la desactivación de la fluorescencia tras la interacción con el analito. Se han propuesto métodos para la detección de cationes ( $\text{Hg}^{2+}$ <sup>119,120</sup>,  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$ <sup>117</sup>,  $\text{Cu}^{2+}$ <sup>121</sup>,  $\text{Ag}^{+}$ <sup>118</sup>,  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Ag}^{+}$ <sup>122</sup>) y aniones (yoduro<sup>123</sup>, cianuro<sup>124,125</sup>),. También se ha llevado a cabo la determinación de moléculas como TNT<sup>126</sup> (2,4,6-trinitrotolueno) o acetona<sup>127</sup> a través del quenching de la luminiscencia de los QDs.

Se han realizado análisis de gases como la benzilamina y trietilamina<sup>128</sup> a través de polímeros que contienen en su interior CdSe QDs, o incluso empleando este mismo principio se han llegado a obtener diferentes patrones de respuesta entre vapores polares y no polares usando QDs de diferente tamaño, y un análisis de datos multiparamétrico, abriéndose la posibilidad a la detección simultánea de más de un gas<sup>129</sup>. Otros estudios incluyen la determinación de espirolactona<sup>130</sup> mediante el quenching de la luminiscencia, o contaminantes como el p-nitrofenol o 1-naftol empleando QD recubiertos con  $\beta$ -ciclodextrina<sup>131</sup>.

Inicialmente esta fue la vía explorada de forma mayoritaria en Química Analítica con el fin de desarrollar novedosos métodos basados en el empleo de QDs, y algunos de ellos han demostrado ser altamente sensibles. Sin embargo, la falta de conocimiento sobre el mecanismo por el cual se ofrecen estas respuestas específicas a determinados analitos, la restricción de este campo a pequeñas moléculas reactivas o iones y la limitada selectividad, así como la gran dependencia de las propiedades superficiales de la nanopartícula pueden ser un inconveniente.

#### **A.4.2 Reconocimiento molecular basado en inmunoensayos de QD.**

Dadas las extraordinarias propiedades de los QDs como fluoróforos de última generación, rápidamente captaron el interés para su potencial uso como marcadores en inmunoensayos porque ofrecían la posibilidad de superar muchas de las limitaciones de los fluoróforos convencionales. A pesar de las dificultades que se encuentran para transferir a estos nanocristales hidrófobos a medio acuoso, el número de inmunoensayos en los que se emplean ha ido creciendo continuamente<sup>132</sup>. La molécula de interés puede ser detectada por medio de una reacción específica con un anticuerpo marcado con el QD. A través de este esquema se han detectado moléculas como p. ej. inmunoglobulina<sup>133</sup>, enterotoxina B o 2,4,5-trinitrotolueno<sup>134</sup>.

Empleando QDs de diferentes longitudes de onda de emisión, cada uno de ellos unido a un anticuerpo distinto, se han detectado de forma simultánea varios analitos

(p. ej. la toxina del cólera, shiga-like, enterotoxina y ricina<sup>113</sup>). En este caso los QDs recubiertos de DHLA (ácido dihidrolipoico) se recubren con MBP (Maltose Binding Protein) y la proteína G (PG) que mediante interacciones electrostáticas a través de su dominio Fc puede unirse al QD. La MBP se utiliza como herramienta de purificación del exceso de anticuerpo durante la formación del bioconjugado, y la PG se utiliza como puente de unión con el anticuerpo antitoxina. El tratamiento de datos se complica porque se requiere la deconvolución de los espectros de fluorescencia obtenidos.

Se han propuesto distintas alternativas para establecer la unión entre la nanopartícula y el anticuerpo. Las más empleadas hasta la fecha son:

a) Empleo de conjugados de QD modificados con avidina<sup>135</sup>. El sistema avidina-biotina (se usa ampliamente en investigaciones biomédicas) ya que la interacción entre la avidina y la biotina posee una elevada afinidad ( $K_d \sim 10^{-15}$  M), además de que el proceso de unión tiene lugar de forma estequiométrica (una biotina por subunidad de avidina). Además, existen un gran número de reactivos disponibles comercialmente (anticuerpos, proteínas, ADN) marcados con biotina.

b) Conjugación de QD con proteínas<sup>136</sup> basado en la interacción de los residuos de histidina (polyHis) con los iones Zn de la superficie de QD CdSe/ZnS. La histidina puede coordinarse a metales tales como el  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  y  $\text{Co}^{2+}$ , y esta propiedad se ha empleado para facilitar el proceso de purificación mediante cromatografía de afinidad de iones metálicos en el diseño de proteínas. Muchas proteínas se diseñan de forma que posean un grupo de histidinas en su extremo N-terminal o C-terminal que actúe como *marca* para facilitar la purificación.

c) Empleo de QD modificados con un polímero anfifílico. Este recubrimiento no sólo ofrece solubilidad en medios acuosos a la nanopartícula sino que facilita la bioconjugación mediante la química del EDC. Sin embargo, el tamaño final de las nanopartículas obtenidas se incrementa en tres o cuatro veces respecto al tamaño original lo que, como hemos comentado a lo largo de la presente Tesis Doctoral, supone una desventaja para llevar a cabo aplicaciones in vivo. Anticuerpos marcados con QD modificados mediante esta vía (purificados mediante cromatografía de exclusión por tamaños, y caracterizados mediante fluorescencia o espectrometría de masas) se han empleado con éxito para la detección de aflatoxina B1<sup>137</sup>.

Con objeto de mejorar la separación entre los anticuerpos marcados con QDs de aquellos unidos al antígeno correspondiente se han empleado en algunos casos

microesferas magnéticas. Estas pueden complicar la detección debido a los problemas de autofluorescencia que pueden interferir con la propia señal de la nanopartícula, aunque se pueden utilizar QDs con una emisión alejada de la dicha autofluorescencia. Se han llegado a emplear de forma conjunta con los QDs para la detección de mezclas de explosivos<sup>138</sup>. Encapsulando un gran número de QDs en el interior de microesferas o microgotas se pretende aumentar la sensibilidad o las posibilidades de detección multianalito<sup>139,140</sup>. Este tipo de ensayos se pueden llevar a cabo sobre un sistema miniaturizado<sup>141</sup>. Una aplicación que revela el potencial de este tipo de inmunoensayos, fue desarrollada por Chang y col., quienes crearon un sistema para la detección simultánea de varios biomarcadores infecciosos<sup>142</sup> (hepatitis B, hepatitis C, VIH) en muestras de suero humano. El volumen de muestra necesario es inferior a 100  $\mu\text{L}$ , el tiempo de análisis menor de una hora y los límites de detección inferiores a los exigidos. El desarrollo del prototipo inicial pretende conducir a un dispositivo portátil, para la detección, monitorización, detección, y prevención de enfermedades infecciosas.

El uso de los QDs en inmunoensayos proporciona una nueva plataforma para la detección de residuos o contaminantes. Así, los QDs han sido empleados con éxito en el desarrollo de inmunoensayos fluorescentes para la detección de residuos de sulfametazina y  $\beta$ -metasona en tejido muscular de pollo<sup>143</sup>, *Escherichia coli*<sup>144</sup> o sulfametazina (SMZ) entre otras<sup>145</sup>.

En estos ensayos los QDs pueden ser utilizados como marca del anticuerpo, anticuerpo secundario o un anticuerpo monoclonal para lograr la detección del residuo de interés. Sin embargo, puesto que el número de residuos es creciente y con objeto de aumentar la rapidez del análisis y reducir los costes, la tendencia actual se dirige hacia el análisis multielemental de contaminantes. Así, Peng y col. consiguieron llevar a cabo la detección simultánea de cinco contaminantes<sup>146</sup> (dexametasona, gentamicin, clonazepan, acetato de medroxiprogesterona y ceftiofur), todos ellos ilegales en China, mediante el empleo de anticuerpos biotinilados conjugados con QDs modificados con BSA (biotinilada) utilizando como puente de unión la avidina. Para llevar a cabo el análisis se emplearon QDs CdTe con emisiones de 520 nm, 545 nm, 570 nm, 590 nm, 635nm. Este esquema se ha aplicado a la detección simultánea de otras proteínas-toxinas<sup>113</sup> presentes en una sola muestra. El interés por este tipo de sistemas de detección multianalito de forma simultánea cada vez es más creciente, no solo para la detección de residuos sino de cualquier analito de interés.



Análisis de este tipo se pueden desarrollar en chips ofreciendo ventajas como el incremento del rendimiento, mayor sensibilidad, menor tamaño de muestra y reducción en el tiempo de análisis. Estas mejoras hacen de los QDs unos prometedores marcadores, en comparación con los fluoróforos convencionales, en el análisis en este tipo de chips. Tennico y col. desarrollaron un método para la detección de trombina<sup>147</sup>, como analito modelo, empleando QDs y esferas magnéticas en chips de microfluidica y diseñando un sistema de inmunoensayos ELISA tipo sandwich. El reconocimiento selectivo de la trombina se llevó a cabo utilizando dos aptámeros capaces de reconocer dos epítetos diferentes de la proteína. A través de esferas magnéticas funcionalizadas con uno de los aptámeros se consigue en primer lugar captar la molécula de interés de la muestra, en este caso trombina, mientras el segundo aptámero marcado con QD se emplea para la detección en el chip. Diseños similares se han empleado para la detección de 7-aminoclonazepan<sup>148</sup> en muestras de orina.

La combinación de los QDs con la tecnología del chip puede crear una nueva plataforma tecnológica que proporcione elevados rendimientos de análisis de las especies de interés.

### **A.4.2.1 Detección de genes.**

La técnica clásica para la detección de la secuencia específica de ácidos nucleicos es la PCR (Polymerase Chain Reaction), y es esencial para el análisis biológico. Sin embargo, la aplicación de los QD en la detección óptica de ácidos nucleicos proporciona nuevas posibilidades de análisis<sup>149</sup> dentro de las que se incluye FISH (Fluorescence In Situ Hybridization), FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer), o microarrays.

Así, se ha desarrollado un método de detección de la hibridación basado en la colocalización multicolor de oligonucleótidos marcados con QDs<sup>150</sup>. Dos sondas de ADN marcadas con QD se combinan con el ADN de interés (analito) para formar una nanoestructura tipo sándwich, y posteriormente esta estructura se detecta mediante colocalización de las sondas marcadas. La combinación de diferentes QDs sobre la misma hebra da lugar a diferentes colores, permitiendo la detección de la hibridación múltiple. Los ensayos demostraron que se puede detectar ADN a nivel molecular, y por lo tanto este es un método adecuado para el análisis de fragmentos de ADN de baja abundancia, a la vez que ofrece posibilidades para el estudio cuantitativo de la cinética del proceso de unión. De forma similar Wang y col. usaron tres tipos de QDs

para la detección de tres secuencias del gen BCRA1 relacionado con el cáncer de mama<sup>151</sup>. Se emplean nanopartículas magnéticas para separar los ácidos nucleicos no hibridados, y así aumentar la sensibilidad, sobre las cuales se inmovilizaban las diferentes sondas para formar la estructura autoensamblada.

#### **A.4.2.2 Aplicaciones en proteómica FRET**

Utilizando QDs como marcadores en la técnica Western Blot para la detección de proteínas, se ha llevado a cabo la detección ultrasensible de proteínas como TRF1, Tin2<sup>152</sup>. Comparado con la tecnología convencional, empleando QDs no se requiere la inmunoprecipitación ni la concentración para incrementar la eficiencia del análisis. En lugar de emplear anticuerpos marcados con QDs para reconocer la proteína de interés, se pretendía incrementar la señal de fluorescencia por lo que se busco un análisis tipo sándwich. Los anticuerpos biotinilados y los QDs biotinilados se pueden complejar a través de la avidina, dando lugar a un incremento de la fluorescencia. Otra aplicación similar con QDs modificados con avidina y empleando como modelo la proteína A fue desarrollada por Chen<sup>153</sup> y col. .

Los QDs marcados con aptámeros han sido otra vía empleada para el desarrollo de una tira fluorescente para la detección rápida de OTA<sup>154</sup>(Ochratoxin) como analito modelo, incluso con una sensibilidad mejor que con tiras similares empleando nanopartículas de oro. Los QDs de forma aislada han sido utilizados para detectar otras proteínas o aminoácidos, p. ej. BSA y L-cisteína. QDs modificados con tres tipos diferentes de azúcares sobre su superficie se emplearon en la detección de diferentes lectinas<sup>155</sup> mediante ensayos de aglutinación, debido a las interacciones multivalentes de la lectina. En el caso de CdTe la fluorescencia de los mismos se puede incrementar en presencia de L-cisteína debido a la conjugación de los grupos tiol de la cisteína con los iones Cd<sup>2+</sup> de la nanopartícula, provocando una reducción de los defectos superficiales<sup>156,157</sup>.

## **A.5 TRANSFERENCIA DE ENERGÍA POR RESONANCIA DE FLUORESCENCIA.**

El proceso FRET (Förster o Fluorescence Resonance Energy Transfer) se ha venido utilizando ampliamente a lo largo de los últimos cincuenta años como una herramienta espectroscópica muy poderosa para análisis químicos y para la investigación de los procesos biológicos. Este mecanismo se ha empleado en el estudio

de procesos biológicos “*in vivo*” e “*in vitro*” entre los que se incluyen estudios de los procesos de hibridación y secuenciación de DNA, la monitorización de los procesos de interacción proteína/proteína y receptor/ligando, en estudios de cambios conformacionales de proteínas y oligonucleótidos en respuesta a estímulos biológicos, y en la observación de procesos dinámicos en membranas celulares. En la mayoría de estos procesos se han utilizado fluoróforos tradicionales (p. ej. colorantes orgánicos, proteínas fluorescentes y sustratos quimioluminiscentes) que presentan algunas limitaciones que reducen la efectividad de la técnica.

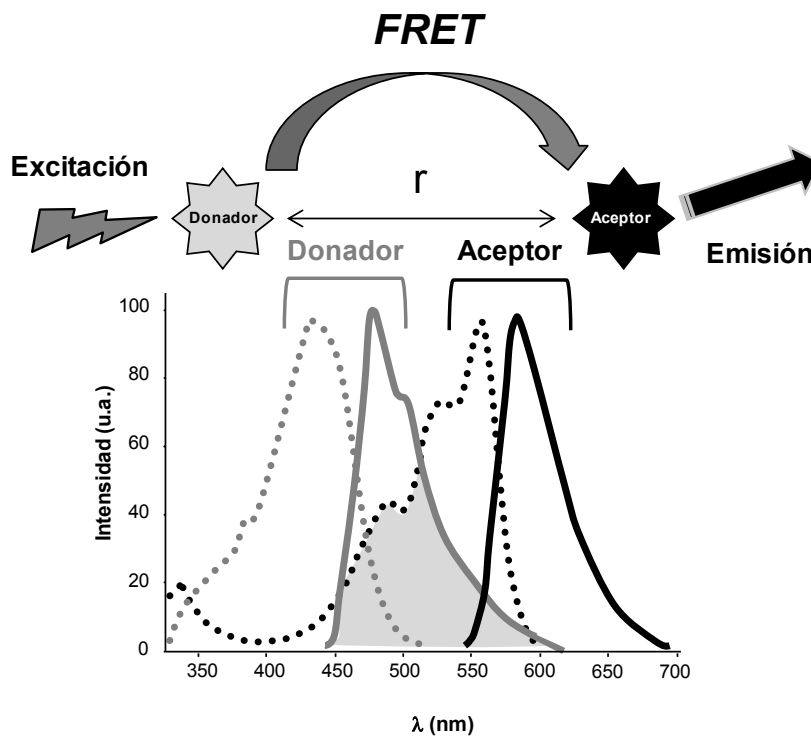
Asimismo, durante los últimos años se ha desarrollado un importante número de metodologías analíticas y sensores químicos basados en medidas de variaciones en la señal fluorescente de un indicador químico debido a procesos de transferencia de energía. Por otro lado, la aparición de una nueva generación de fluoróforos (nanocristales, nanopartículas, polímeros, proteínas codificadas genéticamente), junto con la evolución hacia una instrumentación analítica más sofisticada ha propiciado el desarrollo exponencial que ha experimentado el empleo de esta técnica<sup>158</sup> durante los últimos años.

El gran potencial de la técnica en los campos analítico y bioquímico reside en su elevada sensibilidad frente a pequeños cambios en las distancias de separación (0,5 – 10 nm), y a la orientación entre el par donador/aceptor. Así la información suministrada por esta técnica se basa en el hecho que las distancias favorables para que tenga lugar la transferencia de energía son típicamente del tamaño de una proteína o del espesor de una membrana celular. Si las propiedades espectrales de los fluoróforos permiten el proceso FRET, este tendrá lugar y no estará afectado por las biomoléculas de la muestra.

### **A.5.1 Fundamento.**

El FRET es un proceso no radiativo de transferencia de energía de excitación que tiene lugar a través de un donador (D) en su estado excitado (normalmente un fluoróforo) al estado fundamental de un aceptor (A) cercano a través de interacciones dipolo-dipolo<sup>159</sup>. El aceptor debe absorber energía a las longitudes de onda de emisión del donador, pero no tiene porque necesariamente remitir esa energía en forma de fluorescencia. La transferencia de energía tiene lugar sin la aparición de un fotón y es el resultado de interacciones dipolo-dipolo de largo alcance entre el donador y el aceptor. Para que tengan lugar interacciones tipo FRET eficientes hay dos criterios claves que se

tienen que cumplir: proximidad necesaria entre el donador y el aceptor debido a interacciones dipolo-dipolo de corto alcance, y en segundo lugar debe existir un solapamiento espectral finito entre los perfiles de absorción del aceptor y la emisión del donador (Ver Figura 14).



**Figura 14.** Esquema representativo de un proceso FRET.

Tras la excitación, el estado excitado de la molécula del donador transfiere su energía de forma no radiativa a una molécula de aceptor que se encuentra a una distancia próxima  $r$  del donador. El aceptor libera la energía bien a través de fluorescencia o de canales no radiativos. En el esquema de la Figura 14 se muestran los espectros de absorbancia (Abs) y emisión (Em) de un donador y un aceptor. El solapamiento espectral entre la emisión de la fluorescencia y la absorción del aceptor se observa entre los 500 y 600 nm.

Es importante destacar que el proceso de FRET se basa en el concepto del fluoróforo como dipolo oscilante, que puede intercambiar su energía con otro dipolo con una frecuencia de resonancia similar. Este fenómeno es fundamentalmente distinto, aunque a veces es difícil de distinguirlo de la transferencia de energía radiativa la cual se debe a la emisión y re-absorción de fotones, debido a efectos de filtro interno. La transferencia de energía radiativa depende de las propiedades ópticas no moleculares de la muestra como: el tamaño del contenedor de la muestra, la

longitud del camino, la densidad óptica de la muestra a las longitudes de onda de emisión y excitación, y el ordenamiento geométrico de los caminos de la excitación y la emisión. Mientras que, la transferencia de energía no radiativa contiene una gran cantidad de información estructural relativa al par D-A.

A la hora de aplicar los formalismos de la teoría de Förster, se aproxima el estado excitado de los QDs a un dipolo oscilante, teniendo en cuenta dos factores: el fuerte solapamiento espectral de las funciones de onda de los conductores de carga (par electrón/hueco) en el nanocrystal (tamaño inferior al radio de excitación de Bohr), y que la separación de entre el electrón y el hueco en el interior de la nanopartícula son mucho más pequeños que la longitud de onda de la luz. El tratamiento de la transferencia de energía no radiativa dentro del formalismo de Förster, ha proporcionado una buena descripción de los experimentos en sistemas que emplean QDs únicamente o junto con colorantes convencionales (moléculas orgánicas).

La velocidad del proceso de transferencia de energía  $k_{D-A}$  de un donador a un aceptor separados ambos por una distancia (centro a centro)  $r$  viene dada por la ecuación:

$$k_{D-A}(r) = \frac{1}{\tau_D} \left( \frac{R_0}{r} \right)^6 = \frac{B I Q_D}{\tau_D r^6}$$

**Ecuación 1**

donde  $I$  representa el solapamiento espectral calculado mediante una función integral,  $Q_D$  es el rendimiento cuántico (Quantum Yield), y  $\tau_D$  representa la vida media del estado excitado del donador. La eficiencia de la transferencia de energía  $E$  se define:

$$E = \frac{k_{D-A}}{k_{D-A} + \tau_D^{-1}} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6}$$

**Ecuación 2**

y representa la fracción de excitones que son transferidos de D a A de forma no radiativa. En las expresiones anteriores  $R_0$  es el radio de Förster, e indica la distancia de separación correspondiente al 50 % de eficiencia de FRET, y viene dada por:

$$R_0 = (B Q_D I)^{\frac{1}{6}}$$

**Ecuación 3**

donde  $B$  es una constante que puede ser escrita en función del índice de refracción del medio  $n_D$ , el número de Avogrado  $N_A$ , y  $\kappa_P$  el parámetro de orientación dipolo:

$$B = \frac{[9000(\ln 10)] \kappa_P^2}{128 \pi^5 n_D^4 N_A}$$

**Ecuación 4**

El factor de orientación  $\kappa_p$  toma valores entre 0 (alineación perpendicular del par D-A) y 4 (orientación paralela). El valor  $R_0$  puede ser predicho a partir de las características espectrales del donador y aceptor. En ocasiones la propia orientación del par puede evitar que tenga lugar la transferencia de energía, aunque lo más frecuente es que siempre que las propiedades espectrales sean las adecuadas y la distancia D-A comparable a  $R_0$ , la transferencia de energía tendrá lugar.

De forma experimental, E se calcula mediante medidas de estado estacionario o de tiempo resuelto:

$$E = 1 - \frac{F_{DA}}{F_D}$$

Ecuación 5

$$E = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D}$$

Ecuación 6

donde  $F$  es la intensidad de fluorescencia relativa del donador en la ausencia de ( $F_D$ ) y presencia ( $F_{DA}$ ) del aceptor, y  $\tau$  es el tiempo de vida de la fluorescencia del donador en ausencia ( $\tau_D$ ) y presencia ( $\tau_{DA}$ ) del aceptor.

### A.5.2 Aplicaciones del proceso FRET.

De forma experimental el proceso de FRET se observa<sup>160</sup> como una reducción en la intensidad de fluorescencia del donador, de forma simultánea con un incremento en la señal de fluorescencia del aceptor, si este último es un emisor. De forma similar, el proceso de transferencia se puede traducir en una reducción de la vida media<sup>158</sup> del estado excitado del donador que tiene lugar paralelamente al incremento de la vida media del aceptor.

La gran dependencia de la eficiencia de FRET con la distancia de separación D-A hace que este proceso sea especialmente adecuado para **estudiar distancias en el intervalo de 1 a 10 nm**. Así, una aplicación común es medir distancias entre dos zonas de una misma macromolécula. En un esquema típico una proteína se marca mediante una unión covalente con un donador y un aceptor, (en estudios estructurales de proteínas se suele emplear el triptófano como donador y un aceptor). Sin embargo si se quiere seleccionar el par D/A más adecuado o si este se quiere colocar en una posición concreta, se suele emplear un donador externo.

Si la muestra contiene dos tipos de macromoléculas, una de ellas marcada con el donador y la otra con el aceptor, la asociación de ambas puede ser observada

mediante FRET, sin llegar incluso a calcular la distancia D-A. Las medidas estacionarias se emplean para medir interacciones, en el caso de que se deseen calcular distancias se suelen emplear medidas de tiempo resuelto. Cualquier condición que afecte a la distancia entre el donador y el aceptor, afectará a la velocidad de transferencia y por lo tanto podrá ser cuantificada. Así se puede obtener información estructural sobre una macromolécula, información sobre cambios conformacionales (donde se acerquen o alejen dominios), distancias entre una proteína y la membrana celular, asociación entre subunidades de proteínas<sup>159,160</sup>.

Por otra parte, la metodología FRET también se ha venido usando ampliamente en el desarrollo de metodologías analíticas luminiscentes y sensores químicos luminiscentes basados en medidas de cambios en la intensidad de emisión fotoluminiscente de un indicador en presencia/ausencia del analito. Así, se han propuesto metodologías basadas en la transferencia de energía empleando un aceptor<sup>160</sup> (p. ej. colorante orgánico, péptidos u oligonucleótidos) sensible a la presencia de determinados iones en disolución<sup>161,162</sup> o para pH<sup>163</sup>. Cuando el analito está presente en disolución se modifican las propiedades ópticas de aceptor p. ej. absorbancia tiene lugar una disminución del espectro de absorbancia, lo que se traduce en un incremento de la señal del donador.

### **A.5.3 Quantum Dots como fluoróforos en procesos tipo FRET.**

La mayoría de las aplicaciones basadas en mecanismos de FRET emplean dos tipos de fluoróforos: orgánicos o moleculares y proteínas fluorescentes codificadas genéticamente. Sin embargo, el uso de estos fluoróforos no está exento de algunas limitaciones o problemas. Entre las limitaciones de los fluoróforos tradicionales se incluyen los espectros de excitación estrechos, mientras que presentan espectros de emisión anchos, lo que puede provocar un elevado grado de solapamiento de la absorción del donador y la emisión del aceptor, así como incrementar la emisión del aceptor debido a la excitación directa del mismo. Como consecuencia de este hecho, la implementación de varios sistemas FRET múltiples para monitorizar interacciones de dos o más pares D/A simultáneamente requiere una instrumentación con alta complejidad capaz de llevar a cabo la excitación, la detección, la posterior necesaria deconvolución espectral y el tratamiento de datos. Otras limitaciones de los fluoróforos pueden surgir a causa de los bajos rendimientos cuánticos, sensibilidad al entorno (p. ej. cambios en el pH) en algunos casos, la susceptibilidad a la degradación química y la

fotodegradación, así como la degradación por irradiación continua (*photobleaching*). En el caso de emplear proteínas fluorescentes, son más fáciles de manejar y pueden penetrar de forma más fácil en el interior de la célula, pero poseen bajos rendimientos cuánticos<sup>160</sup>.

Alternativamente los quantum dots presentan una serie de ventajas como fluoróforos donadores que pueden ser beneficiosas para el proceso FRET<sup>160</sup>. Sus espectros de absorción son anchos con elevados coeficientes de extinción molar (del orden de 10 a 100 veces superiores a los colorantes orgánicos) presentan espectros de luminiscencia estrechos (25-50 nm de anchura total a la mitad del máximo) que pueden abarcar desde el UV hasta el IR, con elevados rendimientos cuánticos, una elevada resistencia a la degradación, particularmente a la pérdida de luminiscencia con el tiempo de irradiación (*photobleaching*), y por último presentan una gran separación entre las longitudes de onda de excitación y emisión (*Stokes Shift*).

De entre todas las propiedades optoelectrónicas de los QDs las más interesantes desde el punto de vista del proceso FRET son en primer lugar que el tamaño de estas nanopartículas puede ser “sintonizado” para alcanzar un mejor solapamiento espectral con un aceptor determinado, y en segundo lugar la posibilidad de excitar QDs de diferentes emisiones simultáneamente a longitudes de onda alejadas de las propias emisiones.

La posibilidad de “sintonizar” la emisión fluorescente de los QDs permite aumentar el grado de solapamiento espectral, con lo cual tiene lugar un incremento proporcional del valor de  $R_0$ . Este hecho, junto con el elevado rendimiento cuántico de los quantum dots, posibilita mantener un proceso FRET eficaz con distancias de separación mayores. Puesto que los QDs pueden ser eficazmente excitados a cualquier longitud de onda por debajo de su emisión, la longitud de onda de excitación puede ser escogida de forma que corresponda a un mínimo del espectro de absorción del aceptor, minimizando así la excitación directa del mismo.

El tamaño finito de los quantum dots puede ser una ventaja o un inconveniente para el proceso FRET<sup>158</sup>. El diámetro del núcleo de los QDs de CdSe/ZnS va desde los 5 nm (emisión 510 nm) a más de 8 nm (emisión 610 nm), si no incluimos la capa de ligandos superficiales que puede incrementar entre 2 y 10 nm el tamaño final. Para muchas bioconjugaciones en las que el QD actúa como donador y una proteína marcada con un colorante como aceptor, el valor de  $R_0$  puede estar dentro del radio del quantum dot, lo que proporciona una eficiencia de FRET relativamente baja para el par



D/A formado por un solo QD con un solo aceptor. Sin embargo, se ha observado que para un solo QD como donador con varias proteínas como aceptores, la eficiencia de FRET puede ser incrementada proporcionalmente con la sección transversal del aceptor. Los QDs ofrecen otra ventaja adicional en comparación con los colorantes monovalentes, ya que ofrecen múltiples sitios de funcionalización debido a su gran área superficial. Un nanocrystal de tamaño medio puede alojar varias proteínas marcadas de tamaño medio, y un número más elevado de oligonucleótidos o péptidos. En esta configuración el papel de los QDs es doble, además de aceptores, actúan como una estructura base para la disposición de varias copias del receptor marcado con el aceptor. Esta configuración contribuye a un incremento de la integral de solapamiento al incrementar el número de aceptores, lo que conduce a un incremento final de eficiencia de la transferencia de energía global en comparación con una configuración D/A uno a uno. La eficiencia de la transferencia de energía  $E$  en este caso se calcularía:

$$E = \frac{nk_{D-A}}{nk_{D-A} + \tau_D^{-1}} = \frac{nR_0^6}{nR_0^6 + r^6}$$

**Ecuación 7**

donde  $n$  es el número total de aceptores que interactúan con el mismo donador, suponiendo que todos los aceptores son idénticos y están equidistantes alrededor de un donador central ( $r$  es ahora una distancia D-A fija). Este incremento en la eficiencia de FRET se ha demostrado en varios estudios que emplean QD unidos a proteínas o péptidos marcados con un colorante<sup>169,160,164</sup>. Este hecho demuestra que determinados colorantes a pesar de tener un solapamiento espectral bajo pueden ser empleados con un QD como donador. Además, un amplio rango de FRET puede ser producido para un par D/A variando  $n$ . Este tratamiento tan simplificado, es efectivo para analizar este tipo de configuraciones, pero no es exacto cuando hay múltiples aceptores organizados alrededor del QD a diferentes distancias. La aproximación que hemos mencionado sería válida para configuraciones centro simétricas que presentan eficiencias de FRET relativamente bajas.

Como ya hemos mencionado anteriormente los QDs ofrecen la posibilidad de modificar su emisión luminiscente variando su tamaño o composición, con lo que podríamos, mediante el empleo de los QDs, mejorar el solapamiento de un par D/A. La ventaja de esta propiedad es que combinando por un lado el tamaño del nanocrystal y por otro el material empleado para sintetizar el núcleo del nanomaterial, se puede

llegar siempre a seleccionar unos QDs para optimizar un solapamiento espectral con cualquier aceptor potencial<sup>164</sup>.

La contribución a la emisión del aceptor por parte de la excitación directa es significativa en el caso de los aceptores convencionales, siendo esta como hemos mencionado una de sus limitaciones. Esta contribución hace que el tratamiento de datos requiera la deconvolución de los espectros compuestos para separar las emisiones del donador y el aceptor, y obtener medidas precisas de la eficiencia de FRET. Los QDs pueden ser excitados dentro de un amplio intervalo de longitudes de onda por debajo del primer excitón, lo que ofrece una gran flexibilidad y permite buscar una longitud a la cual el espectro de absorción del aceptor presente un mínimo, mejorando así la relación señal ruido y simplificando el análisis de los datos. Esta ventaja es aún más apreciable en el caso de los experimentos de FRET con una sola molécula, donde esta contribución puede complicar todavía más el análisis.

Los espectros de emisión estrechos y los espectros de absorción anchos características de los QDs favorecen su empleo en el desarrollo de varios sistemas FRET de forma simultánea. La configuración más sencilla en principio sería emplear distintos aceptores en conjunción con el mismo donador QD. En la práctica esta aproximación no es tan sencilla, debido principalmente a la dificultad de la deconvolución espectral necesaria cuando los colorantes tienen unos espectros de emisión anchos, y por la posibilidad de que tenga lugar una transferencia de energía entre los propios aceptores dada la proximidad, que también contribuirá a dificultar el tratamiento de datos. Se ha demostrado que es posible otra configuración más sencilla, en la que se emplean QDs de diferente emisión con el mismo aceptor<sup>165</sup>.

En el empleo de los QDs en la técnica FRET no todo son ventajas. Ya sea en su empleo como donadores o aceptores existen algunas limitaciones. La primera es debida al propio tamaño de la nanopartícula, su tamaño es significativamente mayor que los colorantes moleculares, y no permite un buen acercamiento al aceptor, la mínima distancia de separación permitida es mayor que el radio del nanocrystal. Este problema es todavía más acusado en el caso de los QDs rojos (emisión en torno a 600 nm), su tamaño puede ser el doble del de los QDs azules. Este problema se complica aún más, ya que para poder emplear los QDs en medio acuoso se requieren ligandos hidrofílicos alrededor de la superficie del nanocrystal, lo que incrementa notablemente el tamaño del conjugado final. Teniendo en cuenta todo esto, la relación  $a/R_0$  (donde  $a$  es el radio hidrofílico efectivo del QD, correspondiente al mínimo acercamiento del aceptor)

puede exceder el valor 1. Este parámetro presenta un valor en torno a 1,5 para los QDs recubiertos con estreptavidina disponibles comercialmente, lo que se compensa aumentando el número de aceptores por QD. La segunda limitación se refiere al empleo de los propios QDs como aceptores en el proceso FRET. El escaso número de aplicaciones de los QDs como aceptores puede deberse en primer lugar a los anchos espectros de absorción y sus coeficientes de extinción elevados junto con su gran tamaño que hacen que las nanopartículas puedan ser excitadas simultáneamente junto con el donador, e incluso más favorablemente. En segundo lugar, los QDs tienen tiempos de vida más largos ( $\tau = 10\text{-}50$  ns) que los fluoróforos convencionales<sup>166</sup> ( $\tau = 1\text{-}5$  ns). Este problema puede ser parcialmente resuelto si se emplean aceptores con tiempo de vida más largos (p. ej. iones de tierras raras), o mediante la emisión de donadores generada mediante procesos naturales, p. ej. BRET<sup>167</sup>.

### **A.5.4 Aplicaciones de los QDs en el desarrollo de metodologías bioanalíticas basadas en procesos FRET.**

Hasta la fecha, se han llevado a cabo numerosos desarrollos interesantes mediante la aplicación de FRET como mecanismo de transducción de señales y los QDs como plataforma para la detección de biomoléculas (ácidos nucleicos, proteínas, enzimas) o procesos biológicos. El número de estudios y sensores en los que se ha aplicado el proceso FRET junto con los QDs en un contexto biológico se ha incrementado enormemente a lo largo de los últimos años<sup>168</sup>. Así, algunos desarrollos incluyen sistemas para la detección moléculas de pequeño y gran tamaño: iones, drogas, explosivos, metabolitos, nutrientes, toxinas; sistemas para la detección de oligonucleótidos mediante hibridación, reconocimiento del analito de interés mediante el empleo de aptámeros. Se han construido sistemas también para la detección de proteínas o bien para registrar su actividad enzimática, incluso de forma simultánea<sup>169</sup> empleando quantum dots de diferente tamaño como aceptores<sup>170</sup> o donadores<sup>171</sup> mediante el empleo de FRET.

Empleando los QD como donadores, se puede llevar a cabo la detección de ADN de forma sensible y rápida<sup>172</sup>. El QD se recubre con un oligonucleótido con una secuencia determinada (*ADN capture*) que hibrida en parte con la secuencia diana o de interés, pero al mismo tiempo se pone en medio otra sonda de DNA marcada con el aceptor (*ADN reporter*) que hibrida con otra parte de la secuencia diana. Cuando el ADN a analizar este presente en el medio, tendrá lugar la formación espontánea de la

estructura del nanosensor, lo que se detectará a través de la señal de emisión del aceptor, excitado debido a la proximidad con el donador, en este caso el QD. La nanopartícula también contribuye a amplificar la señal del analito, ya que se inmovilizan varias copias sobre la superficie del QD.

Un formato de ensayo similar se ha aplicado a la detección simultánea de HIV-1 y HIV-2, en este caso la detección de estas dos sondas de ADN<sup>173</sup> en muestras de donantes de sangre, es un método sencillo y rápido de cribado. También se pueden emplear como donador el conjugado QD-ADN y la sonda complementaria marcada como aceptor, para posteriormente mediante medidas de eficiencia de FRET monitorizar el proceso de hibridación<sup>174</sup>. Algar y col.<sup>175</sup> para llevar a cabo la detección de dos secuencias de oligonucleótidos de forma simultánea, emplearon QDs de dos emisiones diferentes conjugadas con dos sondas diferentes de ADN, que posteriormente se hibridan con sus correspondientes sondas complementarias, cada una de ellas marcadas previamente con un aceptor diferente.

Otra posibilidad es usar los QD como donadores junto con una clase especial de oligonucleótidos<sup>176</sup>, *molecular beacons*. En presencia de una sonda complementaria o diana, se inducirá un cambio conformacional en el oligonucleótido inmovilizado sobre la superficie del QD, lo que provocará el incremento de la luminiscencia del donador a consecuencia del incremento en la distancia D-A. Este diseño se emplea habitualmente con otros donadores, pero en este caso mediante el empleo de los QD se consigue la mejora en la fotoestabilidad del conjugado.

De forma similar los aptámeros<sup>177</sup> pueden ser empleados como elemento de reconocimiento para la unión de determinadas proteínas. Así, uno de los aptámeros más estudiado, el aptámero de unión a la trombina<sup>178</sup>, se ha unido a la superficie del QD para la detección de trombina. Para ello el conjugado QD-aptámero se une a una pequeña secuencia de oligonucleótidos marcada con un colorante (aceptor). Cuando la trombina está presente en el medio, la secuencia marcada con el aceptor es desplazada en favor de la unión entre el aptámero y la trombina, y se produce un incremento en la intensidad de emisión del donador.

Por otra parte, los quantum dots unidos a proteínas o anticuerpos, fruto de la especificidad de reconocimiento o de unión proporcionada por el elemento de reconocimiento, pueden emplearse en inmunoensayos competitivos. En este tipo de formato, normalmente se emplea un análogo al analito de interés marcado con el aceptor, que es capturado por el complejo QD-proteína, lo que coloca al aceptor en las

proximidades del donador, con la consiguiente pérdida de luminiscencia por parte de la nanopartícula. Cuando la molécula diana se añade a la disolución, esta competirá con el análogo por la unión con la proteína receptora inmovilizada sobre el QD, desplazando el aceptor de las proximidades de la nanopartícula y contribuyendo así, a un incremento progresivo de la emisión de los QD dependiente de la concentración. Este esquema se ha usado p. ej. en la detección de TNT<sup>179</sup> o maltosa<sup>180</sup>. Empleando esta configuración también puede obtenerse información acerca de la cinética o estimación de la constante de disociación.

Una de las aplicaciones más extendidas es el empleo del FRET para el estudio de la actividad enzimática, principalmente proteasas<sup>169,181</sup>, tripsina<sup>182</sup>, colagenasa<sup>181</sup>,  $\beta$ -lactamasa<sup>183</sup>. El esquema general se basa en la conjugación del QD con numerosas copias de péptidos, a su vez marcados con el aceptor, induciéndose de esta forma el quenching de la fluorescencia de la nanopartícula. Cuando el sistema está equilibrado la adición de una enzima específica provoca la ruptura del péptido, alejando el aceptor de la superficie del QD y provocando la recuperación progresiva de la señal luminiscente. La velocidad de la ruptura del péptido es un proceso cinético, que dependerá de la concentración de proteasa, y que puede ser seguido a través del incremento de la señal luminiscente a partir de ruptura del sustrato (péptido). Es decir, la adición de la enzima provoca cambios en la eficiencia de FRET, y esto permite monitorizar la actividad de la enzima con el tiempo.

Otra alternativa bastante prometedora en cuanto a las posibilidades de aplicaciones *in vivo*, se basa en empleo de los QDs como aceptores de un proceso de bioluminiscencia. La bioluminiscencia es un proceso en el que se generan fotones como resultado de una reacción química, que puede tener lugar en organismos vivos como bacterias. BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer) hace uso de este proceso para transferir esta energía a un aceptor fluorescente cercano, como por ejemplo los QDs. Se han descrito estudios empleando como enzima la Luciferasa<sup>167</sup>, que cataliza la reacción de la coelenterazina. Si la enzima se encuentra inmovilizada sobre la superficie de la nanopartícula, la adición del sustrato provocara la generación de fotones, con la consiguiente excitación del aceptor, ahora los QDs. Lo que se consigue con esta estrategia es la "auto-iluminación" de los QDs, y abre la posibilidad de emplear estos conjugados como sensores para la monitorización de procesos *in vivo* o para la toma de imágenes sin necesidad de emplear una fuente de luz externa, evitando los consiguientes problemas derivados de la propia autofluorescencia de los

tejidos o células, así como los problemas de la fuente externa para penetrar en los tejidos en profundidad.

Una de las vías más prometedoras de este tipo de conjugados y la metodología FRET es sin duda, la potencial aplicación de algún sistema de este tipo para sistemas de detección intracelular, aunque el primer obstáculo a superar es la falta de métodos sencillos de transporte del conjugado final al interior de compartimentos celulares específicos<sup>184</sup>.

Pero además desde un punto de vista químico, existen numerosos procesos biológicos controlados por cambios bruscos en la concentración de iones, p. ej. el calcio o los protones. Si unimos los colorantes cuya absorbancia/fluorescencia sea sensible a variaciones en la concentración de dichos iones sobre la superficie del QD podemos monitorizar de forma precisa estos cambios locales de pH o de un determinado flujo de iones. Un ejemplo sería el trabajo de Raymo<sup>185</sup> y col. que incorpora un complejo ligando orgánico que se asocia con la capa hidrofóbica alrededor de los quantum dots, para formar el conjugado e iniciar el proceso FRET. En función del pH del medio, las propiedades espectrales del complejo varían y por tanto, se modifica el proceso de transferencia de energía. Este desarrollo está limitado por la necesidad de un medio bifásico para llevar a las medidas de pH. En otros ejemplos similares<sup>186,187</sup> se enlaza el aceptor al recubrimiento que hace soluble a la nanopartícula en medio acuoso de forma covalente, nuevamente el perfil de absorción del colorante se modifica con el pH del medio. El conjugado final presenta una relación de señales aceptor/donador dependiente del pH, debido a la dependencia con el pH de la velocidad de transferencia de energía. Existen también sensores para otros iones en disolución, p. ej. Iones metálicos<sup>188</sup>, aunque basados en la interacción directa<sup>117,189,121,124</sup> con el QDs más que en mecanismos de transferencia de energía.

### A.6 BIBLIOGRAFÍA

- <sup>1</sup> G. Schmid, **Nanoparticles from theory to Application**. G. Schmid, Chapter 1: **General Introduction**. 2004, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim. Alemania.
- <sup>2</sup> P.A. Serena, A. Correia, **Nanotecnología: el motor de la próxima revolución tecnológica**. Apuntes de Ciencia y Tecnología, 2003, 9, 32-42.
- <sup>3</sup> K. J. Klabunde, **Nanoscale Materials in Chemistry**. John Wiley & Sons, Chapter 1, K. J. Klabunde, **Introduction to the nanoworld**, 2001.
- <sup>4</sup> S. Iijima, T. Ichihashi, **Single-shell carbon nanotubes of 1-nm diameter**. Nature, 1993, 363, 603-605.
- <sup>5</sup> U. Leonhardt, **Optical metamaterials: Invisibility cup**. Nature photonics, 2007, 1, 207-208.
- <sup>6</sup> Plataforma informativa sobre Nanociencia, recoge información sobre las aplicaciones actuales de la nanotecnología. <http://www.nanotech-now.com> (Consulta Junio 2012).
- <sup>7</sup> A. Correia, P.A. Serena, C. Chacón, M. Fernández, C. Narros, S. Serrano. **Nanociencia y Nanotecnología en España**. Phantoms Phoundation, <http://www.phantomsnet.net/> (Consulta Junio 2012).
- <sup>8</sup> A. Correia, M. Pérez, J. J. Saenz, P. A. Serena, **Nanotechnology applications: a driving force for R&D investment**. Physica status solidi (A), 2007, 204, 1611-1622.
- <sup>9</sup> National Nanotechnology Initiative <http://www.nano.gov/> (Consulta Junio 2012).
- <sup>10</sup> C. M. Niemeyer, **Nanoparticles, proteins, and nucleic acids: biotechnology meets materials science**. Angewandthe Chemie International Edition, 2001, 40, 4128-4158.
- <sup>11</sup> R. P. Feynman, **There's plenty of room at the bottom: An invitation to enter a new field of physics**. Engineering and Science, 1960, 22-36.
- <sup>12</sup> N. Tanaguchi, **On the basic concept of Nanotechnology**. Actas de la International Conference on Production Engineer, 1974, 18-23, Tokyo.
- <sup>13</sup> *Phantoms Foundation es una organización sin ánimo de lucro establecida en 2002 en Madrid con objeto de proporcionar perfiles de gestión de alto nivel a proyectos científicos nacionales y europeos. La organización colabora estrechamente con instituciones europeas y españolas como FECyT (Fundación Española para Ciencia y Tecnología) o la Comisión Europea para elaborar informes sobre la Nanotecnología y otras áreas relacionadas.* <http://www.phantomsnet.net/Foundation/index.php?project=1&intra=1> (Consulta Junio 2012).
- <sup>14</sup> C. L. Poole, J. F. Owens, **Introduction to nanotechnology**. 2003, Wiley.

- <sup>15</sup> The Royal Society, UK National Academy of Science and the Royal Academy of Engineering, **Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties**. ISBN 0 85403 604 0, 2004, The Royal Society, <http://www.nanotec.org.uk/index.htm> (Consulta Junio 2012).
- <sup>16</sup> J. Mongillo, **Nanotechnology 101**, 2007, Greenwood Press, Westport, Connecticut, London.
- <sup>17</sup> H. Brune, H. Ernst, A. Grunwald, W. Grünwald, H. Hofmann, H. Krug, P. Janich, M. Mayor, W. Rathgeber, G. Schmid, U. Simon, V. Vogel, D. Wyrwa, F. Wütscher. **Nanotechnology: Assesment and perspectives**. Springer. Berlin. Germany. 2006.
- <sup>18</sup> Página web sobre Nanotecnología de la Comisión Europea <http://cordis.europa.eu/nanotechnology/o>  
[http://ec.europa.eu/nanotechnology/index\\_en.html#](http://ec.europa.eu/nanotechnology/index_en.html#) (Consulta Junio 2012).
- <sup>19</sup> United States Environmental Protection Agency <http://www.epa.gov/> (Consulta Junio 2012).
- <sup>20</sup> Página web de la empresa Argonide <http://www.argonide.com/> (Consulta Junio 2012)
- <sup>21</sup> Página web de Los Alamos National Laboratory <http://www.lanl.gov/mst/nano/definition.html> (Consulta Junio 2012).
- <sup>22</sup> N. Lewinski, V. Colvin, R. Drezek, **Cytotoxicity of Nanoparticles**. *Small*, 2008, 4, 26-49.
- <sup>23</sup> M. Valcárcel, B. M. Simonet, **Nanomaterials for improved analytical processes**. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2011, 399, 1-2.
- <sup>24</sup> M. Valcárcel, B. M. Simonet, S. Cárdenas, **Analytical nanoscience and nanotechnology today and tomorrow**. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2008, 391, 1881-1887.
- <sup>25</sup> A. I. López-Lorente, B. M. Simonet, M. Valcarcel, **Analytical potential of hybrid nanoparticles**. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2011, 399, 43-54.
- <sup>26</sup> EU Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risk (SCENIHR). Report: Scientific basis for the determination of the term "Nanomaterial", 2010, [http://ec.europa.eu/health/scientific\\_committees/emerging/opinions/index\\_en.htm#nano](http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/emerging/opinions/index_en.htm#nano) (Consulta Junio 2012).
- <sup>27</sup> R. W. Murray, **Nanoparticles: An emerging and lasting frontier**. *Analytical Chemistry*, 2009, 81, 1723.
- <sup>28</sup> Plataforma informativa sobre la Nanotecnología <http://www.azonano.com/> (Consulta Junio 2012).
- <sup>29</sup> J. A. García-Calzón, M. E. Díaz-García, **Synthesis and analytical potential of silica nanotubes**. *Trends in Analytical Chemistry*, 2012, 35, 27-38.
- <sup>30</sup> C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, R. C. Mucic, J. J. Storhoff, **A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials**. *Nature*, 1996, 382, 607-609.



- <sup>31</sup> Z. Wang, L. Ma, **Gold nanoparticles probes**. *Coordination Chemistry Reviews*, 2009, 253, 1607-1618.
- <sup>32</sup> H. Yang, H. Li, X. Jiang, **Detection of foodborne pathogens using bioconjugated nanomateriales**. *Microfluidics and Nanofluidics*, 2008, 5, 571-583.
- <sup>33</sup> L. Gao, J. Zhuang, L. Nie, J. Zhang, Y. Zhang, N. Gu, T. Wang, J. Feng, D. Yang, S. Perrett, X. Yan. **Intrinsic peroxidase-like activity of ferromagnetic nanoparticles**. *Nature Nanotechnology*, 2007, 2, 577-583.
- <sup>34</sup> F. Hernández-Ramírez, A. Tarancon, O. Casals, J. Arbiol, A. Romano-Rodriguez, J. R. Morante, **High response and stability in CO and humidity measures using a single SnO2 nanowire**. *Sensors and Actuators B*, 2007, 121, 3-17.
- <sup>35</sup> M. Valcárcel, S. Cárdenas, B. M. Simonet, **Role of Carbon Nanotubes in analytical science**. *Analytical Chemistry*, 2007, 79, 4788-4797.
- <sup>36</sup> J. Hoogboom, M. Behdani, J. A. A. W. Elemans, M. A. C. Devillers, R. Gelder, A. E. Rowan, T. Rasing, R. J. M. Nolte, **Noncontact Liquid-Crystal Alignment by Supramolecular Amplification of Nanogrooves**. *Angewandte Chemie International Edition*, 2003, 42, 16, 1812-1815.
- <sup>37</sup> F. Valentini, G. Palleschi, **Nanomaterials and Analytical Chemistry**. *Analytical Letters*, 2008, 41, 479-520.
- <sup>38</sup> G. Morales-Cid, A. Fekete, B. M. Simonet, R. Lehmann, S. Cardenas, X. Zhang, M. Valcarcel, P. Schmitt-Kopplin, **In situ synthesis of magnetic multiwalled carbon nanotube composites for clean-up-of (Fluoro)quinolones from human plasma prior to ultrahigh-pressure liquid chromatography analysis**. *Analytical Chemistry*, 82, 2010, 2743-2752.
- <sup>39</sup> J. M. Costa-Fernandez, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, **The use of luminescent quantum dots for optical sensing**. *Trends in Analytical Chemistry*, 2006, 25 (3), 207-218.
- <sup>40</sup> P. Reiss, M. Protiere, L. Li, **Core/Shell Semiconductor Nanocrystals**. *Small*, 2009, 5, 154-168.
- <sup>41</sup> X. Michalet, F. F. Pinaud, L. A. Bentolila, J. M. Tsay, S. Doose, J. J. Li, G. Sundaresan, A. M. Wu, S. S. Gambhir, S. Weiss, **Quantum Dots for Live Cells in Vivo Imaging and Diganostics**. *Science*, 2005, 307, 538-544.
- <sup>42</sup> C. J. Murphy, **Optical sensing with quantum dots**. *Analytical Chemistry*, 2002, 74, 521A-526A.
- <sup>43</sup> G. Schmid, **Nanoparticles from theory to Application**. W. J. Parak, L. Manna, F. C. Simmel, D. Gerion, P. Alivisatos, Chapter 2: **Quantum Dots**. 2004, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim. Alemania.
- <sup>44</sup> W. R. Algar, K. Susumu, J. B. Delehanty, I. L. Medintz, **Semiconductor Quantum Dots in Bioanalysis: Crossing the Valley of Death**. *Analytical Chemistry*, 2011, 83, 8826-8837.

- <sup>45</sup> G. Jaeckel, **Some modern absorption glasses**. *Z. Tech. Phys.*, 1926, 7, 301-304.
- <sup>46</sup> M. Nirmal, B. O. Dabbousi, M. G. Bawendi, J. J. Macklin, J. K. Trautaman, T. D. Harris, L. E. Brus, **Fluorescence intermittency in single cadmium selenide nanocrystals**. *Nature*, 1996, 383, 802-804.
- <sup>47</sup> M. Kuno, D. P. Fromm, H. F. Hamann, A. Gallagher, D. J. Nesbitt, **Nonexponential "blinking" kinetics of single CdSe quantum dots: A universal power law behavior**. *Journal of Chemical Physics*, 2000, 112 (7) 3117-3119.
- <sup>48</sup> C. J. Murphy, J. L. Coffey, **QDs a primer**. *Applied Spectroscopy*, 2002, 56 (1) 16A-27A
- <sup>49</sup> K. E. Sapsford, K. M. Tyner, B. J. Dair, J. R. Deschamps, I. L. Medintz, **Analyzing nanomaterial bioconjugates: a review of current and emerging purification and characterization techniques**. *Analytical Chemistry*, 2011, 83, 4453-4488.
- <sup>50</sup> R. Domingos, M. A. Baalousha, Y. Nam, M. Marciareid, M. M. Reid, N. Tufenkji, J. Lead, G. G. Leppard, K. Wilkinson, **Characterizing manufactured nanoparticles in the Environment: Multimethod Determination of Particle Sizes**. *Environmental Science and Technology*, 2009, 43, 7277-7284.
- <sup>51</sup> S. J. Rosenthal, J. McBride, S. J. Pennycook, L. C. Feldmann, **Synthesis, surface studies, composition and structural characterization of CdSe, core/shell and biologically active nanocrystals**. *Surface Science Reports*, 2007, 62 111-157.
- <sup>52</sup> L. R. Becerra, C. B. Murray, R. G. Griffin, M. G. Bawendi, **Investigation of the surface morphology of capped CdSe nanocrystallites by <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance**. *The Journal of Chemistry Physics*, 1994, 100, 3297-3301.
- <sup>53</sup> W. W. Yu, L. Qu, W. Guo, X. Peng, **Experimental determination of the extinction coefficient of CdTe, CdSe, and CdS Nanocrystals**. *Chemistry of Materials*, 2003, 15, 2854-2860.
- <sup>54</sup> J. E. B. Katari, V. L. Colvin, A. P. Alivisatos, **X-Ray photoelectron spectroscopy of CdSe Nanocrystals with applications to studies of the nanocrystal surface**. *Journal of Physical Chemistry*, 1994, 98, 4109-4117.
- <sup>55</sup> B. O. Dabbousi, J. Rodriguez-Viejo, F. V. Mikulec, J. R. Heine, H. Mattoussi, R. Ober, K. F. Jensen, M. G. Bawendi, **(CdSe)ZnS Core-Shell Quantum Dots: Synthesis and Characterization of a Size Series of Highly Luminescent Nanocrystallites**. *The Journal of Physical Chemistry B*, 1997, 101 (46), 9463-9475.
- <sup>56</sup> A. R. Montoro-Bustos, J. Ruiz-Encinar, M. T. Fernández-Argüelles, J. M. Costa-Fernández, A. Sanz-Medel. **Elemental mass spectrometry: a powerful tool for an accurate characterization at elemental level of quantum dots**. *Chemical Communications*, 2009, 3107-3109.
- <sup>57</sup> F. J. Arregui, **Sensors Based on Nanostructured Materials**. J. Goicoechea, F. J. Arregui, I. R. Matias, Chapter 6: **Quantum dots for Sensing**. 2009, Springer Science + Business Media, LLC.

- <sup>58</sup> A. Henglein, **Photo-degradation and fluorescence of colloidal cadmium sulfide in aqueous solution**. *Berichte der Bunsen-Gesellschaft für Physikalische*, 1982, 86, 301-305.
- <sup>59</sup> L. E. Brus, **A simple model for the ionization potential, electron affinity, and aqueous redox potentials of small semiconductor crystallites**. *Journal of Chemical Physics*, 1983, 79, 5566-5572.
- <sup>60</sup> C. B. Murray, D. J. Norris, M. G. Bawendi, **Synthesis and characterization of nearly monodisperse CdE (E = sulfur, selenium, tellurium) semiconductor nanocrystallites**. *Journal of the American Chemical Society*, 1993, 115, 8706-8715.
- <sup>61</sup> X. Peng, J. Wickham, A. P. Alivisatos, **Kinetics of II-VI and III-V Colloidal Semiconductor Nanocrystal Growth: "Focusing" of Size Distributions**. *Journal of the American Chemical Society*, 1998, 120, 5343-5344.
- <sup>62</sup> Z. A. Peng, X. Peng, **Formation of High-Quality CdTe, CdSe, and CdS Nanocrystals Using CdO as Precursor**. *Journal of American Chemical Society*, 2001, 123, 183-184.
- <sup>63</sup> L. Qu, Z. A. Peng, X. Peng, **Alternative Routes toward High Quality CdSe Nanocrystals**. *Nano Letters*, 2002, 1, 6, 333-337.
- <sup>64</sup> I. Mekis, D. V. Talapin, A. Kornowski, M. Haase, H. Weller, **One-Pot Synthesis of Highly Luminescent CdSe/CdS Core-Shell Nanocrystals via Organometallic and "Greener" Chemical Approaches**. *Journal of Physical Chemistry B*, 2003, 107, 7454-7462.
- <sup>65</sup> M. A. Hines, P. Guyot-Sionnest, **Synthesis and Characterization of Strongly Luminescing ZnS-Capped CdSe Nanocrystals**. *Journal of Physical Chemistry*, 1996, 100, 468-471.
- <sup>66</sup> D. F. Underwooda, T. Kippeny, S. J. Rosenthal, **Charge carrier dynamics in CdSe nanocrystals: implications for the use of quantum dots in novel photovoltaics**. *The European Physical Journal D*, 2001, 16, 241-244.
- <sup>67</sup> X. Peng, M. C. Schlamp, A. V. Kadavanich, A. P. Alivisatos, **Epitaxial Growth of Highly Luminescent CdSe/CdS Core/Shell Nanocrystals with Photostability and Electronic Accessibility**. *Journal of the American Chemical Society*, 1997, 119, 7019-7029.
- <sup>68</sup> P. Reiss, S. Carayon, J. Bleuse, A. Pron, **Low polydispersity core/shell nanocrystals of CdSe/ZnSe and CdSe/ZnSe/ZnS type: preparation and optical studies**. *Synthetic Metals*, 2003, 139, 2003, 649-652.
- <sup>69</sup> A. L. Rogach, T. Franzl, T. A. Klar, J. Feldmann, N. Gaponik, V. Lesnyak, A. Shavel, A. Eychemüller, Y. P. Rakovich, J. F. Donegan, **Aqueous synthesis of thiol-capped CdTe Nanocrystals: State of the art**. *Journal of Physical Chemistry C*, 2007, 111, 14628-14637.
- <sup>70</sup> C. Wang, X. Gao, X. Su, **In vitro and in vivo imaging with quantum dots**. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010, 397, 1397-1415.

- <sup>71</sup> F. Zhang, E. Lees, F. Amin, P. Rivera-Gil, F. Yang, P. Mulvaney, W. J. Parak, **Polymer-coated nanoparticles: A universal tool for biolabelling experiments**. *Small*, 2011, 22, 3113-3127.
- <sup>72</sup> A. M. Smith, S. Nie, **Chemical analysis and celular imaging with quantum dots**. *Analyst*, 2004, 129, 672-677.
- <sup>73</sup> W. C. W. Chan, S. Nie, **Quantum Dot Bioconjugates for Ultrasensitive Nonisotopic Detection**. *Science*, 1998, 281, 2016-2018.
- <sup>74</sup> W. J. Parak, T. Pellegrino, C. Plank, **Labelling of cells with quantum dots**. *Nanotechnology*, 2005, 16, R9-R25.
- <sup>75</sup> J. Aldana, Y. A. Wang, X. Peng, **Photochemical instability of CdSe nanocrystals coated by hydrophilic thiols**. *Journal of the American Chemical Society*, 2001, 123, 8844-4450.
- <sup>76</sup> H. Mattoussi, J. M. Mauro, E. R. Goldman, G. P. Anderson, V. C. Sundar, F. V. Mikulec, M. G. Bawendi, **Self-Assembly of CdSe-ZnS Quantum Dot Bioconjugates Using an Engineered Recombinant Protein**. *Journal of the American Chemical Society*, 2000, 122, 12142-12150.
- <sup>77</sup> M. H. Stewart, K. Susumu, B. C. Mei, I. L. Medintz, J. B. Delehanty, J. B. Blanco-Canosa, P. E. Dawson, H. Mattoussi, **Multidentate Poly(ethylene glycol) Ligands Provide Colloidal Stability to Semiconductor and Metallic Nanocrystals in Extreme Conditions**. *Journal of the American Chemical Society*, 2010, 132, 9804-9813.
- <sup>78</sup> V. V. Breus, C. D. Heyes, K. Tron, G. Nienhaus, **Zwitterionic Biocompatible Quantum Dots for Wide pH Stability and Weak Nonspecific Binding to Cells**. *ACS Nano*, 2009, 3, 2573-2580.
- <sup>79</sup> Y. Liu, M. Kim, Y. Wang, Y. A. Wang, X. Peng, **Highly luminescent, stable, and water-soluble CdSe/CdS core-shell Dendron nanocrystals with carboxylate anchoring groups**. *Langmuir*, 2006, 22, 6341-6345.
- <sup>80</sup> J. Lipka, M. Semmler-Behnke, R. A. Sperling, A. Wenk, S. Takenaka, C. Scheleh, T. Kissel, W. J. Parak, W. G. Kreyling, **Biodistribution of PEG-modified gold nanoparticles following intratacheal installation and intravenous injection**. *Biomaterials*, 2010, 31, 6574-6581.
- <sup>81</sup> F. Pinaud, D. King, H-P. Moore, S. Weiss, **Bioactivation and cell targeting of semiconductor CdSe/ZnS nanocrystals with phytochelatin-related peptides**. *Journal of the American Chemical Society*, 2004, 126, 6115-6123.
- <sup>82</sup> S. Kim, M. G. Bawendi, **Oligomeric ligands for luminescent and stable nanocrystals Quantum Dots**. *Journal of the American Chemical Society*, 2003, 125, 14652-14653.
- <sup>83</sup> M. Bruchez, M. Moronne, P. Gin, S. Weiss, A. P. Alivisatos, **Semiconductor Nanocrystals as Fluorescent Biological Labels**. *Science*, 1998, 281, 2013-2016.
- <sup>84</sup> W. J. Parak, D. Gerion, T. Pellegrino, D. Zanchet, C. Micheel, S. C. Williams, R. Boudreau, M. A. Le Gros, C. A. Larabell, A. P. Alivisatos, **Biological applications of colloidal quantum nanocrystals**. *Nanotechnology*, 2003, 14, R15-R27.

- <sup>85</sup> M. A. Correa-Duarte, M. Giersig, L. M. Liz-Marzan, **Stabilization of CdS semiconductor nanoparticles against photodegradation by a silica coating procedure**. *Chemical Physics Letters*, 1998, 286, 497-501.
- <sup>86</sup> D. Gerion, F. Pinaud, S. C. Williams, W. J. Parak, D. Zanchet, S. Weiss, A. P. Alivisatos, **Synthesis and properties of biocompatible water-soluble silica coated CdSe/ZnS semiconductor Quantum Dots**. *Journal of Physical Chemistry B*, 2001, 105, 37, 8861-8871.
- <sup>87</sup> T. Pellegrino, L. Manna, S. Kudera, T. Liedl, D. Koktysh, A. L. Rogach, S. Keller, J. Radler, G. Natile, W. J. Parak, **Hydrophobic nanocrystals coated with an amphiphilic polymer shell: A general route to water soluble nanocrystals**. *Nano Letters*, 2004, 4, 4, 703-707.
- <sup>88</sup> R. E. Anderson, W. C. W. Chan, **Biocompatible, single, and small ZnS capped quantum dots with amphiphilic polymers**. *ACS Nano*, 2008, 2, 7, 1341-1352.
- <sup>89</sup> B. Dubertret, P. Skourides, D. J. Norris, V. Noireaux, A. H. Brivanlou, A. Libchaber, **In Vivo Imaging of Quantum Dots Encapsulated in Phospholipid Micelles**. *Science* 2002, 298, 1759.
- <sup>90</sup> A. Prakash, H. Zhu, C. J. Jones, D. N. Jones, D. N. Benoit, A. Z. Ellsworth, E. L. Bryant, V. L. Colvin, **Bilayers as phase transfer agents for nanocrystals prepared in nonpolar solvents**. *ACS Nano*, 2009, 3, 8, 2139-2146.
- <sup>91</sup> X. Wu, H. Liu, J. Liu, K. N. Haley, J. A. Treadway, J. P. Larson, N. Ge, F. Peale, M. P. Bruchez, **Immunofluorescence labeling of cancer marker Her2 and other cellular target with semiconductor quantum dots**. *Nature Biotechnology*, 2003, 21, 41-46.
- <sup>92</sup> W. W. Yu, E. Chang, J. C. Falker, J. Zhang, A. M. Al-Somali, C. M. Sayes, J. Johns, R. Drezek, V. L. Colvin, **Forming Biocompatible and Nonaggregated Nanocrystals in Water Using Amphiphilic Polymers**. *Journal of the American Chemical Society*, 2007, 129, 2871-2879.
- <sup>93</sup> R. A. Sperling, T. Liedl, S. Duhr, S. Kudera, M. Zanella, C. A. J. Lin, W. H. Chang, D. Braun, W. J. Parak, **Size Determination of (Bio)conjugated Water-Soluble Colloidal Nanoparticles: A Comparison of Different Techniques**. *The Journal of Physical Chemistry C*, 2007, 111, 11552-11559.
- <sup>94</sup> E. E. Lees, T. L. Nguyen, A. H. A. Clayton, P. Mulvaney, **The Preparation of Colloidally Stable, Water-Soluble, Biocompatible, Semiconductor Nanocrystals with a Small Hydrodynamic Diameter**. *ACS Nano*, 2009, 3, 1121-1128.
- <sup>95</sup> I. Yildiz, E. Deniz, B. McCaughan, S. F. Cruickshank, J. F. Callan, F. M. Raymo, **Hydrophilic CdSe-ZnS Core-Shell Quantum Dots with Reactive Functional Groups on Their Surface**. *Langmuir*, 2010, 26, 11503-11511
- <sup>96</sup> J. M. Klostranec, W. C. W. Chan, **Quantum dots in biological and biomedical research: Recent progress and present challenges**. *Advanced Materials*, 2006, 18, 1953-1964.

- <sup>97</sup> J. D. Mackenzie, E. P. Beschler, **Chemical routes in the synthesis of nanomateriales using the sol-gel process**. *Accounts of Chemical Research*, 2007, 40, 810-818.
- <sup>98</sup> S. T. Selvan, C. Bullen, M. Ashokkumar, P. Mulvaney, **Synthesis of Tunable, Highly Luminescent QD-Glasses Through Sol-Gel Processing**. *Advanced Materials*, 2001, 13, 985-988.
- <sup>99</sup> W. R. Algar, A. J. Tavares, U. J. Krull, **Beyond labels: A review of the application of quantum dots as integrated components of assays, bioprobes, and biosensors utilizing optical transduction**. *Analytica Chimica Acta*, 2010, 673, 1-25.
- <sup>100</sup> J. Lee, V. C. Sundar, J. R. Heine, M. G. Bawendi, K. F. Jensen. **Full Color Emission from II-VI Semiconductor Quantum Dot-Polymer Composites**. *Advanced Materials*, 2000, 12, 1102-1105.
- <sup>101</sup> A. L. Rogach, **Semiconductor Nanocrystal Quantum Dots: Synthesis, Assembly, Spectroscopy and Applications**. D. Wang, Chapter 6: **Semiconductor nanocrystal composites: using polymers for nanocrystal processing**. 2008, Springer. Austria.
- <sup>102</sup> R. Reisfield, T. Saraidov, **Innovative materials based on sol-gel technology**. *Optical Materials*, 2006, 28, 64-70
- <sup>103</sup> V. B. Kandimalla, V. S. Tripathi, H. Ju, **Immobilization of biomolecules in sol-gels: biological and analytical applications**. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 2006, 36, 73-106.
- <sup>104</sup> W. R. Algar, D. E. Prasuhn, M. H. Stewart, T. Jennings, J. B. Blanco-Canosa, P. E. Dawson, I. L. Medintz, **The controlled display of biomolecules on nanoparticles: A challenge suited to bioorthogonal chemistry**. *Bioconjugate Chemistry*, 2011, 22, 825-858.
- <sup>105</sup> F. Pinaud, X. Michalet, L. A. Bentolila, J. M. Tsay, S. Doose, J. J. Li, G. Iyer, S. Weiss, **Advanced in fluorescence imaging with quantum dots bio-probes**. *Biomaterials*, 2006, 27, 1679-1687.
- <sup>106</sup> E. Hutter and D. Maysinger, **Gold nanoparticles and Quantum Dots for bioimaging**. *Microscopy Research and Technique*, 2011, 74, 592-604.
- <sup>107</sup> M. Dahan, S. Levi, C. Luccardini, P. Rostaing, B. Riveau, A. Triller, **Diffusion dynamics of glycine receptors revealed by single-quantum dot tracking**. *Science*, 2003, 302, 442-445.
- dot tracking. *Science* 302:442-445.
- <sup>108</sup> A. L. Rogach, M. Ogris, **Near-infrared-emitting semiconductor quantum dots for tumor imaging and targeting**. *Current Opinion in Molecular Therapeutics*, 2010, 12, 331-339.
- <sup>109</sup> X. Gao, L. Yang, J. A. Petros, F. F. Marshall, J. W. Simons, S. Nie, **In vivo molecular and celular imaging with quantum dots**. *Current Opinion in Biotechnology*, 2005, 16, 63-72.
- <sup>110</sup> X. Gao, Y. Cui, R. M. Levenson, L. W. K. Chung, S. Nie, **In vivo cáncer targeting and imaging with semiconductor quantum dots**. *Nature Biotechnology*, 2004, 22, 969-976.
- <sup>111</sup> U. Resch-Genger, M. Grabolle, S. Cavaliere-Jaricot, R. Nitschke, T. Nann, **Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels**. *Nature Methods*, 2008, 5, 9, 763-775.

- <sup>112</sup> A. M. Coto-García, E. Sotelo-González, M. T. Fernández-Argüelles, R. Pereiro, J. M. Costa-Fernandez, A. Sanz-Medel, **Nanoparticles as fluorescent labels for optical imaging and sensing in genomics and proteomics**. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2011, 399, 29-42.
- <sup>113</sup> E. R. Goldman, A. R. Clapp, G. P. Anderson, H. T. Uyeda, J. M. Mauro, I. L. Medintz, H. Mattoussi, **Multiplexed toxin analysis using four colors of quantum dot fluororeagents**. *Analytical Chemistry*, 2004, 76, 684-688.
- <sup>114</sup> M. Pumera, **Nanomaterials meet microfluidics**. *Chemical Communications*, 2011, 47, 5671-5680.
- <sup>115</sup> S. Giri, E. A. Sykes, T. L. Jennings, W. C. W. Chan, **Rapid screening of genetic biomarkers of infectious agents using quantum dot barcodes**. *ACS Nano*, 2011, 5, 1580-1587.
- <sup>116</sup> L. Spanhel, M. Haase, H. Weller, A. Henglein, **Photochemistry of colloidal semiconductors. 20. Surface modification and stability of strong luminescing CdS particles**. *Journal of the American Chemical Society*, 1987, 109, 5649-5655.
- <sup>117</sup> Y. Chen, Z. Rosenzweig, **Luminescent CdS quantum dots as selective ion probes**. *Analytical Chemistry*, 2002, 74, 5132-5138.
- <sup>118</sup> J-L. Cheng, C-Q. Zhu, **Functionalized cadmium sulfide quantum dots as fluorescence probe for silver ion determination**. *Analytica Chimica Acta*, 2005, 546, 147-153.
- <sup>119</sup> Y-S. Xia, C-Q. Zhu, **Use of surface-modified CdTe quantum dots as fluorescent probes in sensing mercury (II)**. *Talanta*, 2008, 75, 215-221.
- <sup>120</sup> H. Li, Y. Zhang, X. Wang, D. Xiong, Y. Bai, **Calixarene capped quantum dots as luminescent probes for Hg<sup>2+</sup> ions**. *Material Letters*, 2007, 61, 1474-1477.
- <sup>121</sup> M. T. Fernández-Argüelles, W. J. Jin, J. M. Costa-Fernández, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, **Surface-modified CdSe quantum dots for the sensitive and selective determination of Cu (II) in aqueous solutions by luminescent measurements**. *Analytica Chimica Acta*, 2005, 549, 20-25.
- <sup>122</sup> K. M. Gattás-Asfura, R. M. Leblanc, **Peptide-coated CdS quantum dots for the optical detection of copper (II) and silver (I)**. *Chemical Communications*, 2003, 2684-2685.
- <sup>123</sup> J. R. Lakowicz, I. Gryczynski, Z. Gryczunski, C. J. Murphy, **Luminescence spectral properties of CdS nanoparticles**. *Journal of Physical Chemistry B*, 1999, 103, 7613-7620.
- <sup>124</sup> W. J. Jin, M T. Fernández-Argüelles, J. M. Costa-Fernández, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, **Photoactivated luminescent CdSe quantum dots as sensitive cyanide probes in aqueous solutions**. *Chemical Communications*, 2005, 7, 883-885.
- <sup>125</sup> L. Shang, L. Zhang, S. Dong, **Turn-on fluorescent cyanide sensor based on copper ion-modified CdTe quantum dots**. *Analyst*, 2009, 134, 107-113.

- <sup>126</sup> G. H. Shi, Z. B. Shang, Y. Wanga, W. J. Jin, T. C. Zhang, **Fluorescence quenching of CdSe quantum dots by nitroaromatic explosives and their relative compounds**. *Spectrochimica Acta Part A*, 2008, 70, 247-252.
- <sup>127</sup> E. Sotelo-Gonzalez, M. T. Fernández-Argüelles, J. M. Costa-Fernández, A. Sanz-Medel, **Mn-doped ZnS quantum dots for the determination of acetone by phosphorescence attenuation**. *Analytica Chimica Acta*, 2012, 712, 120-126.
- <sup>128</sup> A. Y. Nazzal, L. Qu, X. Peng, M. Xiao, **Photoactivated CdSe nanocrystals as nanosensors for gases**. *Nano Letters*, 2003, 3, 6, 819-822.
- <sup>129</sup> R. A. Potyrailo, A. M. Leach, **Selective gas nanosensors with multisize CdSe nanocrystal/polymer composite films and dynamic pattern recognition**. *Applied Physics Letters*, 2006, 88, 134110/1-13410/3.
- <sup>130</sup> J. Liang, S. Huang, D. Zeng, Z. He, X. Ji, X. Ai, H. Yang, **CdSe quantum dots as luminescent probes for spironolactone determination**. *Talanta* 2006, 69, 126-130.
- <sup>131</sup> H. Li, C. Han, **Sonochemical Synthesis of Cyclodextrin-Coated Quantum Dots for Optical Detection of Pollutant Phenols in Water**. *Chemistry of Materials*, 2008, 20, 6053-6059.
- <sup>132</sup> E. R. Goldmann, I. L. Medintz, H. Mattoussi, **Luminescent quantum dots in immunoassays**. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2006, 384, 560-563.
- <sup>133</sup> B. Suna, W. Xieb, G. Yia, D. Chena, Y. Zhou, J. Cheng, **Microminiaturized immunoassays using quantum dots as fluorescent label by laser confocal scanning fluorescence detection**. *Journal of Immunological Methods*, 2001, 249, 85-89.
- <sup>134</sup> E. R. Goldman, G. P. Anderson, P. T. Tran, H. Mattoussi, P. T. Charles, J. M. Mauro, **Conjugation of Luminescent Quantum Dots with Antibodies Using an Engineered Adaptor Protein To Provide New Reagents for Fluoroimmunoassays**. *Analytical Chemistry*, 2002, 74, 841-847.
- <sup>135</sup> E. R. Goldman, E. D. Balighian, H. Mattoussi, M. K. Kuno, J. M. Mauro, P. T. Tran, G. P. Anderson, **Avidin: A natural bridge for Quantum Dot-Antibody conjugates**. *Journal of the American Chemical Society*, 2002, 124, 6378-6832.
- <sup>136</sup> E. R. Goldmann, I. L. Medintz, A. Hayhurst, G. P. Anderson, J. M. Mauro, B. L. Iverson, G. Georgiou, H. Mattoussi, **Self-assembled luminescent CdSe-ZnS quantum dot bioconjugates prepared using engineered poly-histidine terminated proteins**. *Analytica Chimica Acta*, 2005, 534, 63-67.
- <sup>137</sup> M. T. Fernández-Argüelles, J. M. Costa-Fernández, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, **Simple bio-conjugation of polymer-coated quantum dots with antibodies for fluorescence-based immunoassays**. *Analyst*, 2008, 133, 444-447.



- <sup>138</sup> R. Wilson, D. G. Spiller, I. A. Prior, R. Bhatt, A. Hutchinson, **Magnetic microspheres encoded with photoluminescent quantum dots for multiplexed detection.** *Journal of Material Chemistry*, 2007, 17, 4400-4406.
- <sup>139</sup> Q. Ma, X. Wang, Y. Li, X. Su, Q. Jin, **The use of CdTe quantum dot fluorescent microspheres in fluoro-immunoassays and a microfluidic chip.** *Luminescence*, 2007, 22, 5, 438-445.
- <sup>140</sup> X-X. Zhu, Y-C. Cao, X. Jin, J. Yang, X-F. Hua, H-Q. Wang, B. Liu, Z. Wang, J-H. Wang, L. Yang, Y-D. Zhao, **Optical encoding of microbeads based on silica particle encapsulated quantum dots and its applications.** *Nanotechnology*, 2008, 19, 025708/1-025708/8.
- <sup>141</sup> L. J. Lucas, J. N. Chesler, J-Y. Yoon, **Lab-on-a-chip immunoassay for multiple antibodies using microsphere light scattering and quantum dot emission.** *Biosensors and Bioelectronics*, 2007, 675-681.
- <sup>142</sup> J. M. Klostranec, Q. Xiang, G. A. Farcas, J. A. Lee, A. Rhee, E. I. Lafferty, S. D. Perrault, K. C. Kain, W. C. W. Chan. **Convergence of Quantum Dot Barcodes with Microfluidics and Signal Processing for Multiplexed High-Throughput Infectious Disease Diagnostics.** *Nano Letters*, 2007, 7, 9, 2812-2818.
- <sup>143</sup> S. Ding, J. Chen, H. Jiang, J. He, W. Shi, W. Zhao, J. Shen. **Application of Quantum Dot-Antibody Conjugates for Detection of Sulfamethazine Residue in Chicken Muscle Tissue.** *Journal of the Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54, 6139-6142.
- <sup>144</sup> Y-C. Kuo, Q. Wang, C. Ruengruglikit, H. Yu, Q. Huang, **Antibody-conjugated CdTe Quantum Dots for Escherichia coli detection.** *The Journal of Physical Chemistry C*, 2008, 112, 4818-4824.
- <sup>145</sup> J. Shen, F. Xu, H. Jiang, Z. Wang, J. Tong, P. Guo, S. Ding, **Characterization and applications of quantum dot nanocrystal-monoclonal antibody conjugates for the determination of sulfamethazine in milk by fluoroimmunoassay.** *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2007, 389, 2243-2250.
- <sup>146</sup> C. Peng, Z. Li, Y. Zhua, W. Chena, Y. Yuana, L. Liua, Q. Li, D. Xua, R. Qiaob, L. Wanga, S. Zhua, Z. Jin, C. Xua, **Simultaneous and sensitive determination of multiplex chemical residues based on multicolor quantum dot probes.** *Biosensors and Bioelectronics*, 2009, 24, 3657-3662.
- <sup>147</sup> Y. H. Tennico, D. Hutanu, M. T. Koesdjojo, C. M. Bartel, V. T. Remcho, **On-Chip Aptamer-Based Sandwich Assay for Thrombin Detection Employing Magnetic Beads and Quantum Dots.** *Analytical Chemistry*, 2010, 82, 5591-5597.
- <sup>148</sup> W. Chena, C. Penga, Z. Jin, R. Qiaoc, W. Wang, S. Zhue, L. Wang, Q. Jin, C. Xua, **Ultrasensitive immunoassay of 7-aminoclonazepam in human urine based on CdTe**

- nanoparticle bioconjugations by fabricated microfluidic chip.** *Biosensors and Bioelectronics*, 2009, 24, 2051-2056.
- <sup>149</sup> W. R. Algar, M. Massey, U. J. Krull, **The application of quantum dots, gold nanoparticles and molecular switches to optical nucleic-acid diagnostics.** *Trends in Analytical Chemistry*, 2009, 28, 3, 292-306.
- <sup>150</sup> Y-P. Ho, M. C. Kung, S. Yang, T-H. Wang, **Multiplexed hibridization detection with multicolor colocalization of quantum dot nanoprob.** *Nano Letters*, 2005, 5, 9, 1693-1697.
- <sup>151</sup> J. Wang, G. Liu, A. Merkoci, **Electrochemical coding technology for simultaneous detection of multiple DNA targets.** *Journal of the American Chemical Society*, 2003, 125, 3214-3215.
- <sup>152</sup> R. Bakalova, Z. Zhelev, H. Ohba, Y. Baba, **Quantum dot-based western blot technology for ultrasensitive detection of tracer proteins.** *Journal of the American Chemical Society*, 2005, 127, 9328-9329.
- <sup>153</sup> W. Chen, D. Xu, L. Liu, C. Peng, Y. Zhu, W. Ma, A. Bian, Z. Li, Yuanyuan, Z. Jin, S. Zhu, C. Xu, L. Wang, **Ultrasensitive detection of trace protein by western blot based on POLY-Quantum dot probes.** *Analytical Chemistry*, 2009, 81, 9194-9198.
- <sup>154</sup> L. Wang, W. Chen, W. Ma, L. Liu, W. Ma, Y. Zhao, Y. Zhu, L. Xu, H. Kuang, C. Xu, **Fluorescent strip sensor for rapid determination of toxins.** *Chemical Communications*, 2011, 47, 1574-1576.
- <sup>155</sup> P. Babu, S. Sinha, A. Surolia, **Sugar-Quantum Dot Conjugates for a Selective and Sensitive Detection of Lectins.** *Bioconjugate Chemistry*, 2007, 18, 146-151.
- <sup>156</sup> Y. Wang, J. Zhenga, Z. Zhanga, C. Yuana, D. Fua, **CdTe nanocrystals as luminescent probes for detecting ATP, folic acid and l-cysteine in aqueous solution.** *Colloids and Surface A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2009, 342, 102-106.
- <sup>157</sup> S. Huang, Q. Xiaoa, R. Li, H-L. Guana, J. Liua, X-R. Liua, Z-K. Hea, Y. Liua, **A simple and sensitive method for l-cysteine detection based on the fluorescence intensity increment of quantum dots.** *Analytica Chimica Acta*, 2009, 645, 73-78.
- <sup>158</sup> K. E. Spasford, L. Berti, I. L. Medintz, **Materials for Fluorescence Resonance Energy Transfer Analysis: Beyond Traditional Donor-Acceptor Combinations.** *Angewandthe Chemie International Edition*, 2006, 45, 4562-4588.
- <sup>159</sup> J. R. Lakowicz, **Principles of Fluorescence Spectroscopy.** Third Edition, 2006, Springer. Singapore.
- <sup>160</sup> A. R. Clapp, I. L. Medintz, H. Mattoussi, **Förster Resonance Energy Transfer Investigations using Quantum-Dot.** *A European Journal of Chemical Physics and Physical Chemistry*, 2006, 7, 47-57.

- <sup>161</sup> J. Díaz-García, J. M. Costa-Fernández, N. Bordel, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, **Energy transfer-room temperatura phosphorescence for the optosensing of transition metal ions**. *Analytica Chimica Acta*, 2003, 486, 1-10.
- <sup>162</sup> M. J. Ruedas-Rama, X. Wang, E. A. H. Hall, **A multio-ion particle sensor**. *Chemical Communication*, 2007, 1544-1546.
- <sup>163</sup> W. J. Jin, J. M. Costa-Fernández, A. Sanz-Medel, **Room temperature phosphorescence pH optosensor based on energy transfer**. *Analytica Chimica Acta*, 2001, 431, 1-9.
- <sup>164</sup> A. R. Clapp, I. L. Medintz, J. M. Mauro, B. R. Fisher, M. G. Bawendi, H. Mattoussi, **Fluorescent Resonance Energy Transfer between Quantum Dots donors and dye-labeled protein acceptors**. *Journal of the American Chemical Society*, 2004, 126, 301-310.
- <sup>165</sup> A. R. Clapp, I. L. Medintz, H. T. Uyeda, B. R. Fisher, E. R. Goldman, M. G. Bawendi, H. Mattoussi, **Quantum Dot-Based Multiplexed Fluorescence Resonance Energy Transfer**. *Journal of the American Chemical Society*, 2005, 127, 18212-18221.
- <sup>166</sup> A. R. Clapp, I. L. Medintz, B. R. Fisher, G. P. Anderson, H. Mattoussi, **Can luminescent Quantum Dots be efficient energy acceptors with organic dye donors?** *Journal of the American Chemical Society*, 2005, 127, 1242-1250.
- <sup>167</sup> M. So, C. Xu, A. M. Loening, S. S. Gambhir, J. Rao, **Self-illuminating quantum dots conjugates for in vivo imaging**. *Nature Biotechnology*, 2006, 24, 3, 339-343.
- <sup>168</sup> W. R. Algar, U. J. Krull, **Quantum dots as donors in fluorescence resonance energy transfer for the bioanalysis of nucleic acids, proteins and other biological molecules**. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2008, 391, 1609-1618.
- <sup>169</sup> I. L. Medintz, A. R. Clapp, F. M. Brunel, T. Tiefenbrunn, H. T. Uyeda, E. L. Chang, J. R. Deschamps, P. E. Dawson, H. Mattoussi, **Proteolytic activity monitored by fluorescence resonance energy transfer through quantum dot peptide conjugates**. *Nature Materials*, 2006, 5, 581-589.
- <sup>170</sup> M. Suzuki, Y. Husimi, H. Komatsu, K. Suzuki, K. T. Douglas, **Quantum dot FRET biosensors that respond to pH, to proteolytic or nucleolytic cleavage, to DNA synthesis, or to a multiplexing combination**. *Journal of the American Chemical Society*, 2008, 130, 5720-5725.
- <sup>171</sup> D. Geiler, L. J. Charbonnière, R. F. Ziessel, N. G. Butlin, H. Löhmannsröben, N. Hildebrandt, **Quantum dot biosensors for ultrasensitive multiplexed diagnostics**. *Angewandte Chemie International Edition*, 2010, 49, 1396-1401.
- <sup>172</sup> C-Y. Zhang, H-C. Yeh, M. T. Kuroki, T-H. Wang, **Single-quantum dot-based DNA nanosensor**. *Nature Materials*, 2005, 4, 826-831.
- <sup>173</sup> C-Y. Zhang, J. Hu, **Single quantum dot-based nanosensor for multiple DNA detection**. *Analytical Chemistry*, 2010, 82, 1921-1927.

- <sup>174</sup> D. Zhou, L. Ying, X. Hong, E. A. Hall, C. Abell, D. Klenerman, **Compact functional Quantum Dot-DNA conjugate: Preparation, hybridization, and specific label-free DNA detection**. *Langmuir*, 2008, 24, 1659-1664.
- <sup>175</sup> W. R. Algar, U. J. Krull, **Towards multi-colour strategies for the detection of oligonucleotide hybridization using quantum dots as energy donors in fluorescence resonance energy transfer (FRET)**. *Analytica Chimica Acta*, 2007, 581, 193-201.
- <sup>176</sup> J. H. Kim, D. Morikisa, M. Ozkan, **Adaptation of inorganic quantum dots for stable molecular beacons**. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2004, 102, 315-319.
- <sup>177</sup> S. Tombelli, M. Minunni, M. Mascini, **Aptamers-based assays for diagnostics, environmental and food analysis**. *Biomolecular Engineering*, 2007, 24, 191-200.
- <sup>178</sup> M. Levy, S. F. Cater, A. D. Ellington, **Quantum-Dot Aptamer Beacons for the Detection of Proteins**. *A European Journal of Chemical Biology*, 2005, 6, 2163-2166.
- <sup>179</sup> E. R. Goldmann, I. L. Medintz, J. L. Whitley, A. Hayhurst, A. R. Clapp, H. T. Uyeda, J. R. Deschamps, M. E. Lassman, H. Mattoussi, **A hybrid Quantum Dot-Antibody fragment Fluorescence Resonance Energy Transfer-based TNT sensor**. *Journal of the American Chemical Society*, 2005, 127, 6744-6751.
- <sup>180</sup> I. L. Medintz, A. R. Clapp, H. Mattoussi, E. R. Goldman, B. Fisher, J. M. Mauro, **Self-assembled nanoscale biosensors based on quantum dot FRET donors**. *Nature Materials*, 2003, 2, 630-638.
- <sup>181</sup> L. Shi, V. De Paoli, N. Rosenzweig, Z. Rosenzweig, **Synthesis and applications of quantum dots FRET-based protease sensors**. *Journal of the American Chemical Society*, 2006, 128, 10378-10379.
- <sup>182</sup> L. Shi, N. Rosenzweig, Z. Rosenzweig, **Luminescent Quantum Dots Fluorescence Resonance Energy Transfer-Based Probes for Enzymatic Activity and Enzyme Inhibitors**. *Analytical Chemistry*, 2007, 79, 208-214.
- <sup>183</sup> C. Xu, B. Xing, J. Rao, **A self-assembled quantum dot probe for detecting b-lactamase activity**. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, 344, 931-935.
- <sup>184</sup> K. Saha, A. Bajaj, B. Duncan, V. M. Rotello, **Beauty in skin deep: A surface monolayer perspective on nanoparticle interactions with cells and biomacromolecules**. *Small*, 2011, 7, 14, 1903-1918.
- <sup>185</sup> M. Tomasulo, I. Yildiz, S. L. Kaanumalle, F. M. Raymo, **pH-Sensitive ligand for luminescent of Quantum Dots**. *Langmuir*, 2006, 22, 10284-10290.
- <sup>186</sup> P. T. Snee, R. C. Somers, G. Nair, J. P. Zimmer, M. G. Bawendi, D. G. Nocera, **A ratiometric CdSe/ZnS Nanocrystal pH Sensor**. *Journal of the American Chemical Society*, 2006, 128, 13320-13321.

<sup>187</sup> Y. Chen, R. Thakar, P. T. Snee, **Imparting nanoparticles function with size-controlled amphiphilic polymers**. *Journal of the American Chemical Society*, 2008, 130, 3744-3745.

<sup>188</sup> X. Wang, X. Guo, **Ultrasensitive Pb<sup>2+</sup> detection based on fluorescence resonance energy transfer (FRET) between quantum dots and gold nanoparticles**. *Analyst*, 2009, 134, 1348-1354.

<sup>189</sup> C. Bo, Z. Ping, **A new determining method of copper (II) ions at ng mL<sup>-1</sup> levels based on quenching of the water-soluble nanocrystals fluorescence**. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2005, 381, 986-992.

## **B. OBJETIVOS**



---

A raíz de lo expuesto en la Introducción de la presente Memoria de Tesis Doctoral, podemos afirmar que la Nanociencia y la Nanotecnología son dos áreas del conocimiento de nueva generación, aunque actualmente ya constituyen uno de los pilares básicos de los presentes avances científicos, y este papel crucial se incrementará a lo largo de los próximos años.

En efecto, el estudio de la materia a escala nanométrica y la aplicación de las excepcionales y ventajosas propiedades químico-físicas que demuestran los nanomateriales ha despertado un gran interés en una gran mayoría de los ámbitos científico-tecnológicos, y particularmente en el campo de la Química Analítica. Así, uno de los nanomateriales que más interés ha suscitado en el desarrollo de nuevas metodologías de análisis químico y bioquímico, debido a sus demostradas excepcionales propiedades como marcador luminiscente, son los Quantum Dots. Sin embargo, a pesar de su extraordinario potencial los desarrollos aparecidos durante los últimos años en esta línea investigadora aún son relativamente escasos, debido principalmente a las dificultades encontradas en la manipulación de este tipo de nanopartículas con fines analíticos.

En este contexto, con objeto de optimizar el desarrollo de nuevas aplicaciones bioanalíticas basadas en el empleo de nanopartículas semiconductoras cristalinas es preciso llevar a cabo una caracterización exhaustiva del nanomaterial a utilizar en diferentes entornos y condiciones experimentales.

Por otro lado, existe una creciente demanda de aplicaciones que requieren llevar a cabo análisis químicos rápidos y fiables, preferentemente de forma directa sobre la muestra o con el mínimo tratamiento sobre la misma, con una elevada sensibilidad y selectividad. Con frecuencia se recurre a técnicas analíticas sofisticadas que proporcionan gran cantidad de información, pero que hacen uso de instrumentación compleja y costosa, por lo que sería preferible una alternativa que haga uso de metodologías más sencillas. De ahí surge el interés por el diseño y la construcción de “sensores químicos”, es decir, dispositivos sencillos, de bajo costo, con mínimo mantenimiento y fáciles de usar, pero que permitan detectar y/o cuantificar una especie química concreta de forma directa en un medio complejo por medio de una interacción química selectiva (idealmente específica) y reversible. En este contexto, los procesos luminiscentes (fluorescencia y fosforescencia) resultan adecuados para el desarrollo de sensores ópticos. Sin embargo, debido a la escasez de compuestos indicadores luminiscentes disponibles, y a los problemas de estabilidad y sensibilidad



de las fases sensoras todavía son escasos los desarrollos implementados con éxito. Una posible solución a la escasez de indicadores podría pasar por el empleo de Quantum Dots como indicadores luminiscentes en el desarrollo de optosensores luminiscentes.

Por todo ello, el **objetivo principal** de la presente Tesis Doctoral es profundizar en el estudio y conocimiento de los QDs para su posterior aplicación en el desarrollo de aplicaciones para bioanálisis. Este objetivo general se abordará a través de los siguientes objetivos parciales:

1. **Estudio comparativo de las distintas estrategias de solubilización de Quantum Dots en medio acuoso.** La síntesis coloidal de nanopartículas es la vía más sencilla y conocida de producción de nanocristales de alta calidad. Este procedimiento permite conseguir un mejor control sobre la dispersión de tamaños y la superficie final de la nanopartícula. Sin embargo, este tipo de procedimientos nos proporcionan QDs estables de forma aislada pero en medio orgánico. El primer paso necesario antes de emplear los QDs en cualquier aplicación bioanalítica pasa por hacer solubles estas nanopartículas en medios acuosos. En esta Tesis Doctoral se evaluarán distintas estrategias de solubilización en medio acuoso de QDs fotoluminiscentes de distinta naturaleza (con núcleos de CdSe o de CdSe/ZnS) a través de la variación de las propiedades luminiscentes con el tiempo y en diferentes entornos químicos. Para alcanzar el objetivo, se emplearán distintas herramientas como la microscopía electrónica o de fluorescencia, la espectrometría molecular o el AFFF (Asymetrical Flow Field Flow Fractionation) como herramientas complementarias para conseguir una apropiada caracterización de los distintos nanocristales.

2. **Evaluación del efecto de la fotoactivación sobre la evolución de la señal luminiscente de los QDs con el tiempo.** Muchos investigadores han observado la variación de la intensidad de la señal luminiscente de las nanopartículas semiconductoras cuando se irradia de forma continua durante tiempos relativamente largos. Durante dicho proceso conocido como “fotoactivación” se produce un incremento, inicialmente beneficioso, de la señal de nuestra especie fluorescente. Sin embargo, de cara a diseñar un procedimiento analítico basado en QDs que experimentan procesos de fotoactivación es necesario controlar apropiadamente dicho proceso.

Por ello, en este segundo objetivo se evaluará la influencia del proceso de fotoactivación sobre la señal de luminiscencia de los QDs con el tiempo, así como el desplazamiento del máximo de emisión de muestras de QDs con diferente modificación superficial, con la finalidad de elucidar el mecanismo principal implicado en dicho proceso.

**3. Diseño de un procedimiento sencillo y general de inmovilización de Quantum Dots de CdSe/ZnS en un soporte sólido como vía de desarrollo de sensores ópticos basados en mecanismos de fluorescencia con transferencia de energía.** En la actualidad existe un creciente interés en el desarrollo de sensores ópticos basados en la inmovilización sobre un soporte sólido adecuado de nanopartículas luminiscentes semiconductoras con el objeto de conseguir fases sensoras con elevada estabilidad. Hasta la fecha distintos autores han llevado a cabo diversos intentos de incorporar nanopartículas obtenidas mediante síntesis coloidales, en el interior de soportes sólidos de variada naturaleza. Sin embargo, frecuentemente se ha observado un deterioro en las características espectroscópicas de las nanopartículas inmovilizadas.

Aprovechando la experiencia previa en el Grupo de Investigación, se estudiará el empleo de la tecnología sol-gel para poner a punto un procedimiento general de inmovilización de nanopartículas semiconductoras sobre un soporte sólido estable, inerte y transparente.

Con objeto de evitar el lixiviado del nanomaterial y la indeseable modificación de las propiedades luminiscentes de la nanopartícula tras el proceso de inmovilización se investigarán distintas estrategias tales como la inmovilización de las nanopartículas a través de enlaces covalentes entre la estructura del nanomaterial y la estructura polimérica del sol-gel.

Con objeto de evaluar la aplicabilidad de los QDs inmovilizados dentro de un medio sólido como indicadores luminiscentes “pasivos” en el desarrollo de nuevas fases sensoras fluorescentes se investigará la posibilidad de desarrollar sistemas tipo FRET mediante la coinmovilización de un aceptor adecuado con los QDs atrapados en la matriz sólida.

#### **4. Desarrollo de una fase sensora luminiscente basada en QDs para la determinación de vapores orgánicos utilizando herramientas quimiométricas.**

Una familia de métodos de análisis químicos basados en el empleo de nanopartículas como especies indicadoras hacen uso de la medida de las interacciones entre los átomos de la superficie de la nanoestructura y especies reactivas que se encuentran en el entorno de la nanopartícula para llevar a cabo la determinación de dichas especies. En este contexto, se ha comprobado que QDs de CdSe presentan una intensa emisión fotoluminiscente que es seriamente afectada por la presencia de vapores orgánicos en el medio.

El cuarto objetivo parcial de la presente Tesis Docotoral se centrará en el desarrollo de una fase sensora fotoluminiscente de vapores orgánicos basada en la inmovilización de QDs de CdSe/ZnS en una matriz inorgánica sol-gel (siguiendo el procedimiento optimizado en el objetivo anterior) y llevando a cabo medidas de desactivación de la luminiscencia de los QDs inmovilizados tras la exposición a los vapores orgánicos.

Dada la limitada selectividad que suelen poseer este tipo de metodologías de análisis, se recurrirá a herramientas del ámbito de la quimiometría para llevar a cabo el tratamiento de datos y procurar diseñar un método de medida que permita discriminar entre distintos compuestos químicos que causen un efecto similar sobre la luminiscencia de los QDs.

**5. Empleo de los Quantum Dots como donadores de energía en el desarrollo de metodologías basada en fluorescencia con transferencia de energía.** En el último objetivo de la presente Tesis Doctoral se pretende evaluar la aplicabilidad de los Quantum Dots sistemas donadores de energía en el desarrollo de sistemas basados en FRET (Förster Resonante Energy Transfer), en el que la emisión de los Quantum Dots se emplearía como fuente de excitación de una especie fluorofora que actúa como aceptor en el sistema. Para ello se estudiará la funcionalización de las nanopartículas con un indicador fluorescente capaz de reconocer un determinado analito, con el fin de llevar a cabo su determinación mediante la medida de FRET.

La estrategia a seguir en la consecución del presente objetivo está basada en la incorporación del aceptor dentro del recubrimiento polimérico empleado para otorgar estabilidad coloidal a las nanopartículas que actúan como elemento donador,

manteniendo una distancia donador/aceptor que permita elevadas eficiencias del proceso de transferencia de energía.



## **C. EXPERIMENTAL**



---

## C.1 INSTRUMENTACIÓN EMPLEADA

- ✓ Espectrómetro de luminiscencia Varian Cary Eclipse (Varian Ibérica) equipado con lámpara de xenón (potencia de pico equivalente a 75 KW), monocromadores Czerny-Turner y detector mediante tubo fotomultiplicador modelo R-298. El programa de control y tratamiento de datos, Cary Eclipse, opera bajo entorno Windows.
- ✓ Espectrómetro de luminiscencia Perkin Elmer Modelo LS-50B, provisto de ordenador con programa de control y tratamiento de datos bajo Windows denominado FL-Winlab.
- ✓ Espectrómetro UV/Vis/NIR modelo Lambda 900 Perkin Elmer, provisto de ordenador con programa de control y tratamiento de datos bajo entorno de Windows (W-Winlab).
- ✓ Espectrómetro UV/Vis modelo Genesys 10S UV-Vis Thermo Scientific.
- ✓ Espectrofluorímetro Horiba Jobin Yvon FluoroLog 3 TCSPC (Time Correlated Single Photon Counting) con laser de diodo de excitación 375 nm.
- ✓ Horiba-Jobin-Yvon (NJ) DynaMic para la medidas FLIM (Fluorescence Intensity and Lifetime Imaging) para la caracterización de materiales fotosensibles. Equipado con un laser pulsado como fuente de excitación con pulsos del orden de nanosegundos (H-J-Y NanoLED-470LH) incluyendo un microscopio de epifluorescencia confocal (Olympus BX51, NY) equipado con una cámara CCD (uEye UI-1450-C, ICS, Alemania) 1600x1200 pixels. En las medidas llevadas a cabo a lo largo de la presente Tesis Doctoral el láser se disparó seleccionando el pico de emisión 405 nm con un pulso de 900 ps de anchura y 100 KHz de velocidad de repetición. Como filtro de interferencia se utilizó Chrom HQ470/20x, VT en el paso de excitación y un espejo dicroico (Olympus Q490DCXR) a 490 nm. Se colocó un filtro de corte (CG-OG-590-1.00-3, CVI Technical Optics, UK) para minimizar la detección de la luz dispersada. El equipo dispone de un controlador H-J-Y FluoroHub para la detección secuencial *single photon timing* conectado a un modulo de detección *picosecond photon* H-J-Y TBX equipado con un detector PMT sensible al rojo con un refrigerador termoeléctrico para disminuir el ruido. Para ventanas de tiempo mayores a 500 ns, se han ajustado tiempos de retardo variables con respecto al pulso de disparo con una ventana externa y un generador de retardo (Ortec 416A, TN).



- ✓ Equipo de fraccionamiento en flujo con campo de flujo asimétrico equipado con un detector de luz dispersada multiángulo AF4-MALS (Asymmetrical Flow Field Flow Fractionation- Multi-Angle Light Scattering) que hace uso de un sistema de cromatografía líquida Agilent 1100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) y un sistema de separación Eclipse 3 (Wyatt Technology Europe, Dernbach, Germany). Se utilizó un canal de separación de dimensiones: 152 mm largo, 21,5 mm ancho, 350  $\mu$ m. Las membranas empleadas para la separación son de celulosa regenerada (Wyatt Technology Europe) utilizadas como pared de acumulación con un tamaño de corte de 30 kDa. Todas las disoluciones empleadas como fase móvil fueron filtradas previamente con filtros de 0,1  $\mu$ m (Millipore). Como disolvente se utiliza una disolución reguladora de boratos (SBB) pH 9. El programa de separación empleado en los estudios realizados en esta Tesis Doctoral incluyen: una velocidad del flujo del detector es de 1 mL, un flujo cruzado variando entre 4,00 y 0 mL (inicio-fin), un gradiente empleado para el cambio de flujo cruzado de 9 minutos (comenzando a partir de 6 minutos de elución), un flujo de enfoque de 1,50 mL, y un tiempo de enfoque de 1 minuto. Después de completar el programa de elución, el flujo cruzado se mantiene a 0 mL/min durante al menos cinco minutos para asegurar la completa elución de las nanopartículas y especies de mayor tamaño. La detección en línea de las especies obtenidas se llevo a cabo con espectrómetro Vis/UV Agilent 1100 PDA, un DAWN HELEOS MALS (Wyatt Technology Corporation, Santa Barbara, CA), y un detector IR Optilab rEX (Wyatt Technology Corporation). Se hace uso de un programa de control Wyatt Eclipse@ChemStation Version B.03.01 (Wyatt Technology Europe) para controlar los flujos y el detector PDA. El programa informático Astra V (Wyatt Technology Corporation) controla el detector IR y MALS. Para calcular el radio hidrodinámico de las nanopartículas a partir de los valores de tiempo de retención, basados en la teoría de AF4, se utilizó el programa Wyatt Chromatogram versión 1.0.3 (Wyatt Technology Europe).
- ✓ pH metro modelo micro pH 2000 (Crison)
- ✓ Microscopio de fluorescencia automático (Olympus BX61) equipado con óptica de: 4x, 10x, 20x, 40x, 100x y un bloque de filtros para fluorescencia: UV (BP 360-370), azul (BP470-490) y verde (BP530-550).
- ✓ Balanza Precisa 180 A, con precisión hasta  $\pm 0,01$  mg.
- ✓ Baño de ultrasonidos J. P. Selecta.
- ✓ Equipo de agua Milli-Q Advantage, Millipore.

- ✓ Rotavapor Heidolph WB2000/VV2000.
- ✓ Centrífuga Biofuge Stratus, Heraeus.
- ✓ Microscopio Electrónico de Transmisión (MET JEOL-200 EXII) de kilovoltaje máximo 200 Kv, poder de resolución 3,4 Å entre líneas, sistema fotográfico: cámara de placas 6,5x9,5 y película 35 mm, e imagen digitalizada con salida a PC (sistema digital micrograph GATAN).
- ✓ Estufa de laboratorio, Memmert modelo 100.

## **C.2 MATERIAL Y REACTIVOS**

### **C.2.1 Material empleado en los sistemas de análisis por inyección de flujo**

- ✓ Celda de cuarzo de flujo convencional para medidas de luminiscencia, Hellma Suprasil 176.052-QS de 1,5 mm de paso óptico.
- ✓ Bomba peristáltica de cuatro canales modelo Miniplus 2 (Scharlab).
- ✓ Tubos para bomba peristáltica Kendall Elkay, tubería de PTFE de 0,8 mm de diámetro interno y conectores suministrados por Ommifit.
- ✓ Tubos bomba peristáltica (rojo-rojo) suministrado por Scharlab.
- ✓ Válvula de inyección de seis vías Rheodyne dotada de loops de inyección de varios tamaños.

### **C.2.2 Material empleado para la síntesis de quantum dots**

- ✓ Cámara hinchable de polietileno flexible para asegurar una atmósfera controlada y aislada (Sigma-Aldrich) mediante un flujo constante de Argón.
- ✓ Manta calefactora modelo Fibroman-N (J. P. Selecta) acoplada a un sistema de control digital de temperatura modelo Electemp (J. P. Selecta).
- ✓ Agitador magnético modelo RCT basic (Kika werke).
- ✓ Lámpara UV con longitud de onda de emisión de 365 nm 6 W (Vilber Lourmat).

### **C.2.3 Material general**

- ✓ Celda de cuarzo de flujo convencional para medidas de luminiscencia, Hellma Suprasil 176.052-QS de 1,5 mm de paso óptico.

- ✓ Celda de cuarzo convencional para medidas de luminiscencia, Hellma (modelo 101-QS con paso óptico de 10 mm).
- ✓ Celda de cuarzo convencional para medidas de luminiscencia, Hellma (modelo 114F-QS con paso óptico de 10 mm).
- ✓ Micropipetas Labmate y Finnipipette de volúmenes graduables.
- ✓ Tamices con diversos diámetros de poro y mortero de ágata.
- ✓ Material volumétrico de vidrio de calidad contrastada.
- ✓ Portaobjetos de vidrio para microscopio para la medida de fluorescencia.

#### C.2.4 Reactivos y disoluciones.

Todos los reactivos utilizados han sido de grado “pureza analítica” y no se realiza en ellos ningún tipo de purificación previa a su uso a no ser que se indique lo contrario. Las disoluciones acuosas empleadas han sido preparadas disolviendo la cantidad adecuada de reactivo sólido y utilizando agua ultrapura destilada desionizada (Mili-Q).

Los reactivos empleados han sido:

**Tabla 1.** Lista de reactivos utilizados a lo largo de este trabajo.

Reactivo	Pureza	Casa Comercial	Referencia
(3-Aminopropil) trietoxisilano	≥98%	Fluka	09324
2-mercaptoetanol	≥99%	Sigma	63689
Acetato de sodio	---	Merck	1.06267
Acetona	---	VWR Prolabo	86656.320
Ácido 2-mercaptoacético	97%	Aldrich	475343
Ac. 2-mercaptoetanosulfónico	98%	Aldrich	63705
Ácido Acético	99,8%	Sigma	33209
Ácido Bórico	---	Merck	A015.4260 038

Ácido Clorhídrico	---	Merck	
Ácido hexilfosfónico	---	Alfa Aesar	44121
Argón	99,9999%	Air Liquid	----
Bis-hexametilentriamina	95%	Fluka	14506
Cloroformo anhidro	≥99%	Sigma-Aldrich	372978
Cloruro de Calcio	98%	Merck	A863082740
Cloruro de N-Etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida	98%	Fluka	03450
Cloruro de sodio	---	Merck	1.06404
Cloruro potásico		Panreac	141494
Dietilzinc 1,0 M		Aldrich	29,611-2
Dodecilamina	98%	Sigma-Aldrich	D222208
Etanol	99,5%	VWR Prolabo	20820.293
ETH 1001	99%	Fluka	21192
ETH 5294	---	Fluka	27086
Hexametildisilatiano / Bis(trimetilsilil) sulfuro	Grado Síntesis	Sigma	283134
Hidróxido de tetrabutilamonio 40 % en agua	---	Sigma	86854
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	---	Merck	A186504938
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	---	Merck	A215573 015
Metanol	Grado HPLC	VWR Prolabo	20864.320

EXPERIMENTAL

Metanol anhidro	99,8%	Sigma-Aldrich	322415
Metiltrimetoxisilano (MTMOS)	≥98%	Fluka	69471
NaOH	---	Merck	B0466398004
Óxido de trioctilfosfina (TOPO)	99%	Aldrich	22330-1
Poli(anhídrido isobutilen-alt- maleico)	12-200 mesh (85%)	Aldrich	531278
Púrpura de Bromocresol	----	Fluka	32642
Rhodamine 6G	Fluorescenci a	Fluka	83697
Selenio	99,99%	Aldrich	229865
Sulfito de Sodio	98%	Merck	1.06657
Tereftalato de sodio	99%	Alfa Aesar	042946
Tetrametilortosilicato (TMOS)	≥98%	Fluka	87682
Trioctilfosfina (TOP)	90%	Aldrich	117854
X-Rhod-1	---	Invitrogen	14210

**C.2.4.1 Disoluciones patrón.**

Disolución patrón de Calcio de 0.1 M preparada disolviendo la cantidad apropiada de cloruro de calcio dihidratado en agua desionizada Milli-Q.

Disolución de púrpura de bromocresol  $5 \cdot 10^{-6}$  M preparada disolviendo la cantidad apropiada del reactivo en agua desionizada Milli-Q.

Disolución de una fracción de 50  $\mu$ g de X-Rhod-1 de la casa Sigma Aldrich en 200  $\mu$ L cloroformo anhidro.

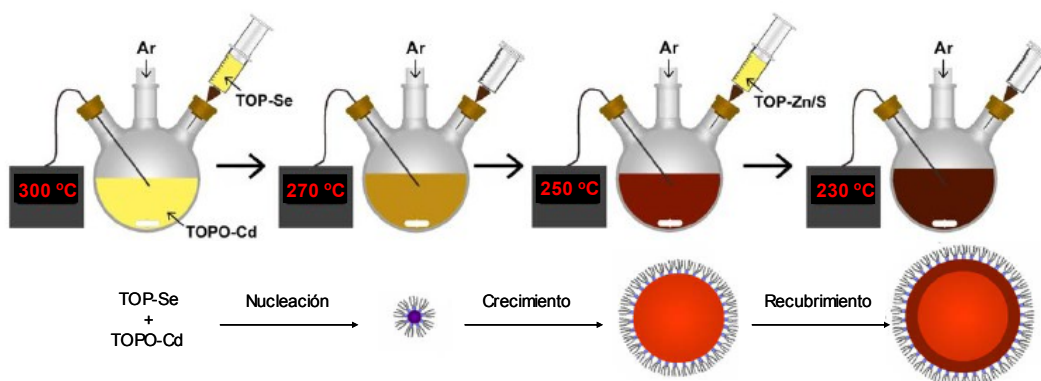
Disolución de ETH 1001 o ETH 5294 preparada disolviendo la cantidad apropiada del reactivo en cloroformo.

### C.3 PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

#### C.3.1 Síntesis de quantum dots

La preparación de las disoluciones de reactivos para la síntesis de quantum dots se realiza bajo atmósfera inerte siguiendo un procedimiento ya optimizado en nuestro Grupo de Investigación<sup>1</sup> utilizando CdO, adaptado a partir del procedimiento descrito por Peng<sup>2</sup> y col. . En primer lugar se disuelve 1,62 mmol de polvo de Se en 7,5 mL trioctilfosfina (TOP) para conseguir una disolución de Se en trioctilfosfina (SeTOP).

La mezcla Zn/S/TOP que se emplea para formar el recubrimiento de sulfuro de zinc se prepara bajo la misma atmósfera inerte mezclando 1,23 mmol de hexametildisilatiato, 1,75 mmol de dietilzinc y 10,25 mL de TOP. A continuación en un matraz de tres bocas, en la misma atmósfera inerte, se depositan 1,23 mmoles de CdO, 0,6 g de HPA (Ácido hexilfosfónico) y 17,5 g de óxido de trioctilfosfina (TOPO). La Figura 15 recoge esquemáticamente el proceso de síntesis de QDs de CdSe/ZnS empleado en este trabajo.



**Figura 15.** Esquema típico de síntesis de QDs CdSe/ZnS a altas temperaturas<sup>3</sup>.

El matraz de tres bocas se coloca en una manta calefactora equipada con un termopar y un controlador de temperatura y se calienta a 300-320 °C bajo un flujo constante de Argón de 15 a 20 min para favorecer la completa disolución del precursor de cadmio en los disolventes coordinantes HPA y TOPO. Una vez disuelto se baja la temperatura a 270 °C, y se inyectan rápidamente 6 mL de la disolución de Se en TOP.

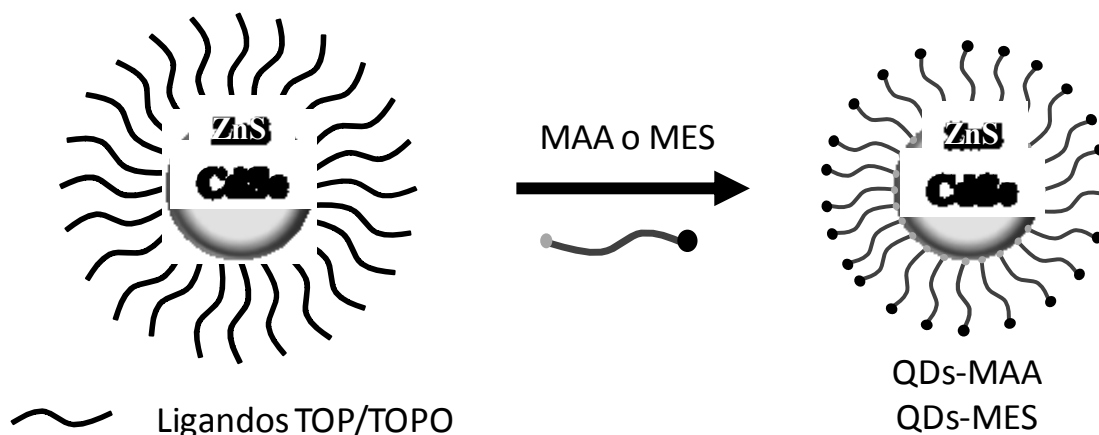
Tras la adición se baja la temperatura hasta 250 ° C, durante esta etapa tiene lugar el proceso de nucleación. Después del proceso de inyección de SeTOP, los nanocristales se dejan crecer en torno a 12 minutos a dicha temperatura. Una vez alcanzado el tamaño de partícula deseado se reduce de nuevo la temperatura hasta 230 ° C y se adicionan 7,5 mL de la mezcla Zn/S/TOP de forma lenta, con objeto de permitir el crecimiento de una capa de recubrimiento adicional de ZnS sobre las nanopartículas de CdSe formadas durante la etapa anterior. La adición tiene que tener lugar de forma lenta para asegurar no favorecer la aparición de núcleos de ZnS. Una vez finalizado el proceso de adición, se mantiene el sistema a 100 ° C durante 1 hora tras la cual se deja que alcance temperatura ambiente para proceder a su purificación. La disolución obtenida se transfiere a un tubo de centrifugación y se diluye con cloroformo anhidro. Para completar el proceso de purificación a la disolución final de QDs se le añade metanol, y se somete a centrifugaciones sucesivas a 5000 r.p.m. durante 5 minutos para separar los quantum dots mediante precipitación. La fase líquida del sobrenadante se decanta para eliminar cualquier exceso de reactivos. Los quantum dots ya purificados se redispersan en cloroformo anhidro.

### **C.3.2 Síntesis del polímero anfifílico**

Para sintetizar el polímero anfifílico PMA75C12 empleado para llevar a cabo la solubilización de los QDs se siguió un procedimiento ya optimizado previamente<sup>4,5</sup>. Para ello se disuelven 15 mmol de dodecilamina en 100 mL de tetrahidrofurano, que se añaden rápidamente sobre 20 mmol del monómero de anhídrido de poli(isobutileno-alt-maleico) bajo agitación constante. A continuación se sónica durante 20 segundos, y calienta a 55-60 °C durante 1 h. Después de este proceso, se lleva a cabo la preconcentración de la disolución hasta obtener una tercera parte del volumen inicial para favorecer la reacción entre la amina y el polímero. Una vez que la muestra ha sido concentrada, se agita durante doce horas. Transcurrido este tiempo se evapora lentamente el disolvente hasta sequedad, y el polímero se redisuelve en 25 mL de cloroformo anhidro para obtener una disolución final con una concentración estimada de 0,8 M de monómero.

### C.3.3 Modificación de la superficie de los quantum dots por un proceso de intercambio de ligandos.

Para llevar a cabo la modificación de la superficie de los QDs con ligandos bifuncionales, se toma una alícuota de 5 mL de la disolución ya purificada de la síntesis de quantum dots y se añade sobre una disolución de 10 mL de metanol que contiene 1 mL de hidróxido de tetrabutilamonio y 0,3 g ácido mercaptoetanosulfónico (QDs-MES) para obtener nanocristales hidrosolubles a través del grupo sulfonato<sup>6</sup> o bien 1 mL de ácido mercaptoacético (QDs-MAA) para obtener la solubilidad en medio acuoso a través del grupo ácido<sup>7</sup>. La mezcla se somete a un reflujo durante doce horas, tras el cual los quantum dots ya modificados se separan del exceso de reactivos mediante centrifugación a 15000 r.p.m. y posterior decantación del sobrenadante líquido. Finalmente los quantum dots se dispersan en la disolución reguladora de interés.



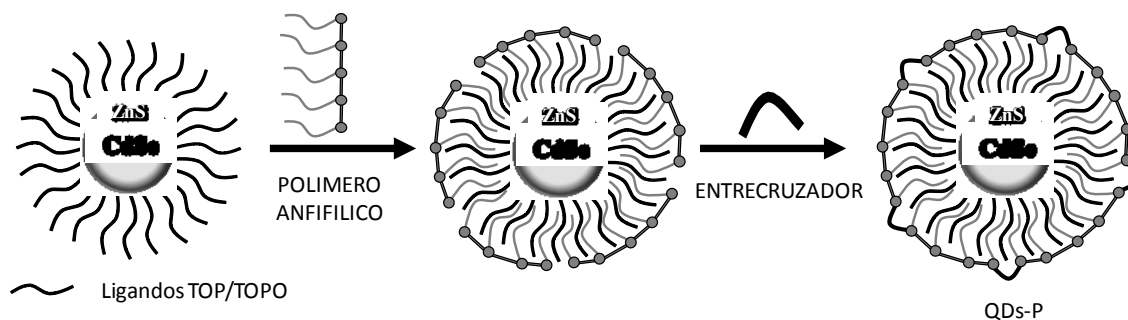
**Figura 16.** Representación esquemática del proceso de modificación de QDs por intercambio de ligandos.

### C.3.4 Modificación de la superficie de los quantum dots por interacción con polímero anfifílico.

El proceso de modificación de los quantum dots por interacción con el polímero anfifílico (QDs-P) requiere la estimación previa del tamaño de las nanopartículas, así como su concentración<sup>4</sup> (que se lleva a cabo siguiendo el procedimiento descrito en el epígrafe C.3.6). En primer lugar a una disolución de quantum dots de concentración conocida con un tamaño medio concreto se la mezcla con la cantidad necesaria del polímero que previamente hemos sintetizado, y se somete a un proceso de agitación para favorecer la interacción hidrofóbica entre las cadenas de trioctilfosfina y el



polímero. Esta disolución se somete a un proceso de evaporación controlada hasta sequedad en rotavapor. Con objeto de estabilizar la estructura final, a la mezcla llevada a sequedad se le añade la cantidad necesaria de una disolución de bis-hexametilentriamina 0,02 M que actúa como entrecruzador para enlazar algunos de los grupos ácido del polímero que ahora forman parte de la estructura externa de la nanopartícula.



**Figura 17.** Representación esquemática del proceso de solubilización mediante la incorporación con polímero anfifílico.

En un caso concreto, habitualmente llevado a cabo en el laboratorio, se añade un volumen aproximado de 2 mL de polímero anfifílico (PMA75C12) sobre una disolución de 100 mL de quantum dots de concentración  $\sim 2,8 \mu\text{M}$  suspendidas en cloroformo anhidro. Posteriormente, la disolución se calienta a  $55\text{-}60 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 40 segundos para favorecer las interacciones hidrofóbicas entre las cadenas de TOP/TOPO y la región apolar del polímero. Tras este proceso se somete a la mezcla a un proceso de agitación y evaporación lenta del disolvente en un rotavapor. Una vez llevado a sequedad, 4 mL de una disolución 0,02 M de bis(hexametileno)triamina en cloroformo se añaden sobre la película sólida que obtenemos en el matraz, y se deja la mezcla agitando durante 15 minutos. Finalmente, se somete a la muestra al mismo proceso de evaporación, y cuando la muestra se encuentra completamente seca, se dispersa en una disolución reguladora de  $\text{pH} = 12$ .

Las nanopartículas obtenidas se someten a una etapa de filtración con filtros de  $0,22 \mu\text{m}$  de tamaño de poro con objeto de eliminar los agregados de mayor tamaño que se hayan podido formar durante el proceso de recubrimiento.

### C.3.5 Modificación del pH de las disoluciones coloidales de quantum dots.

Tras llevar a cabo el procedimiento general de modificación de la superficie de los QDs para obtener nanopartículas solubles en medio acuoso, estas se redispersan en una disolución reguladora de SBB de pH 12 (se ha demostrado que es el medio que da mayor estabilidad a los QDs coloidales). Si posteriormente se necesita asegurar que los QDs se encuentren a un pH distinto, en el caso de las nanopartículas modificadas por intercambio de ligandos (QD-MES y QD-MAA) tras el proceso de purificación se lleva a cabo la redisolución en la disolución reguladora de interés. Sin embargo, en el caso de los QD-P tras el proceso de modificación es necesario redissolver en una disolución reguladora de pH 12. Este pH básico es necesario para que los grupos anhídrido del polímero utilizado se abran y den lugar a los grupos carboxilo necesario para proporcionar la solubilidad en medio acuoso, de ahí la imposibilidad de redissolver en disoluciones reguladoras que no tengan un pH altamente básico. Cuando queramos tener los QDs-P a un pH diferente es necesario hacer uso de la ultracentrifugación mediante filtros de membrana (*Centricon, Amicon*). Se escogió esta vía debido a su facilidad de uso, y porque permiten por un lado preconcentrar la muestra de QDs-P en caso de que necesitemos concentraciones elevadas de nanopartículas, y por otro desalinizar los QDs de forma secuencial. En el procedimiento se usaron membranas de ultrafiltración de celulosa con un tamaño de corte de 100 kDa, cuyo esquema se recoge en la Figura 18 Cada muestra se somete de forma individual al proceso de ultracentrifugación. Antes de llevar a cabo la centrifugación (3500 r.p.m.) se añade un volumen de la disolución reguladora en la que pretendamos dispersar nuestros QDs-P. Todo lo que tenga un peso molecular  $\geq 100$  kDa no atraviesa la membrana, permanece en la parte superior del *Amicon*, denominada disolución retenida. Los QDs-P tienen un peso molecular superior a esos 100 kDa, por lo que formaran parte siempre de esa disolución retenida mientras que en el vial del filtrado tendremos los restos salinos y aquel material con un peso inferior a 100 kDa. Las muestras se someten al menos a dos lavados con un volumen de la reguladora de interés del triple del volumen de muestra, para asegurarnos de que el cambio de pH ha tenido lugar de forma efectiva. La capacidad de los *Amicones* puede ser de 4 mL o 15 mL, en función del volumen de muestra que necesitemos modificar. Una vez realizados los lavados la muestra se recupera del interior del dispositivo con la ayuda de una micropipeta con cuidado de no tocar con la punta de la micropipeta la membrana, lo que provocaría la rotura del

filtro, y por tanto lo inutilizaría para emplearlo en el cambio de pH de una nueva muestra. El volumen final de la muestra puede ser del orden de 200  $\mu\text{L}$ -500  $\mu\text{L}$  partiendo de 4 mL de QD-P dependiendo de la concentración. El proceso total de preconcentración o modificación del pH puede variar entre 10 minutos y 3 horas, en función del volumen total de muestra a tratar.



**Figura 18.** Filtros de membrana (Amicon, Centricon) para la ultracentrifugación.

### C.3.6 Estimación de la concentración y tamaño de los QDs.

La estimación de la concentración y del tamaño de las nanopartículas se lleva a cabo mediante medidas espectrofotométricas. A partir de numerosos datos experimentales obtenidos mediante TEM y XRD, y de otros datos recogidos en la bibliografía se han construido una serie de curvas empíricas para la estimación del tamaño del núcleo de QDs de CdSe, CdS y CdTe. En el caso concreto de los QDs de CdSe la determinación del tamaño de las nanopartículas se lleva a cabo empleando la Ecuación 8. Propuesta por Peng<sup>8</sup> y col., esta ecuación nos permite estimar a partir de la longitud de onda del primer excitón del espectro de absorbancia el diámetro de las nanopartículas.

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

**Ecuación 8**

donde  $D$  es el tamaño en nm de una determinada muestra de nanocristales,  $\lambda$  es la longitud de onda del primer excitón del espectro de absorbancia de la muestra correspondiente. Hay que señalar que esta ecuación polinómica basada en datos experimentales no ofrece resultados fiables para el intervalo de tamaños fuera de las nanopartículas empleadas en las medidas experimentales (2-8 nm). Una vez conocido el valor del tamaño del núcleo de las nanopartículas  $D$ , podemos obtener el valor del coeficiente de extinción molar. También a partir de datos experimentales se ha desarrollado otra ecuación para calcular el coeficiente de extinción molar  $\epsilon$  por mol de nanocristal (L/mol cm).

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

**Ecuación 9**

Una vez conocidos el valor de  $\epsilon$  a la longitud de onda del primer excitón, si aplicamos la ley de Lambert-Beer podemos conocer la concentración de nanopartículas:

$$A = \epsilon C L$$

**Ecuación 10**

donde  $A$  es el valor de la absorbancia a la longitud de onda del primer excitón para una muestra dada,  $C$  es la concentración (mol/L) de los nanocristales en la muestra y  $L$  es la longitud de paso óptico utilizada para la medida de absorbancia (normalmente 1 cm).

La Ecuación 9 y Ecuación 10 son válidas siempre que la alícuota utilizada para la medida de concentración tenga una baja concentración de QDs (para evitar la reabsorción), y su espectro de luminiscencia sea estrecho y simétrico. Es necesario corregir el valor de la absorbancia  $A_m$  obtenido a partir de las medidas experimentales utilizando la semianchura a la mitad del máximo del primer excitón del espectro de absorbancia (hwhm half width at the half-maximum) en la parte del espectro absorbancia de longitudes de onda largas.

$$A = \frac{A_m(hwhm)_{UV}}{K}$$

**Ecuación 11**

donde  $K$  es el valor medio de hwhm de las muestras estándares utilizadas para el desarrollo de las ecuaciones empíricas y tiene un valor 14 de para los QDs de CdSe.

Si utilizamos el espectro de fotoluminiscencia como alternativa para hacer la corrección del valor de absorbancia se puede utilizar la ecuación

$$A = \frac{A_m(fwhm)_{UV}}{K'}$$

**Ecuación 12**

donde fwhm es la anchura total a mitad del máximo del espectro de luminiscencia (fwhm full width at the half maximum), y  $K'$  es el valor medio de fwhm de de las muestras estándares utilizadas para el desarrollo de las ecuaciones empíricas y tiene un valor 25 de para los QDs de CdSe.

### **C.3.7 Evaluación del rendimiento cuántico.**

El tiempo de vida de la fluorescencia y el rendimiento cuántico son quizás las características más importantes de un fluoróforo. El rendimiento cuántico o eficiencia cuántica de un fluoróforo  $Q$  (Quantum Yield) representa el número de fotones emitidos por una muestra respecto al número de fotones absorbidos<sup>9</sup>. En otras palabras, la eficiencia cuántica nos da la probabilidad de desactivación del estado excitado a través de la fluorescencia, en detrimento de otros mecanismos no radiativos. Las sustancias con los rendimientos más elevados, cercanos a la unidad, como las rodaminas presentan las emisiones más brillantes. El tiempo de vida es también importante en un fluoróforo y condiciona el tiempo disponible para que el fluoróforo interaccione con su entorno, y por lo tanto la información disponible a partir de su emisión.

Existen numerosos procedimientos<sup>10</sup> para estimar el rendimiento cuántico de un fluoróforo, pero sin duda la forma más sencilla es a través de la comparación con estándares de rendimiento cuántico conocido, cuyo valor es independiente de la longitud de onda de excitación, por lo que estos pueden utilizarse donde quiera que muestren una absorción útil. La medida del  $Q$  se logra mediante la comparación entre la fluorescencia integrada de la muestra desconocida con la fluorescencia integrada del patrón. La densidad óptica u absorbancia de las muestras debe mantenerse por debajo de las 0,1 unidades (si se emplean cubetas con un paso óptico de 10 mm) para evitar efectos de filtro interno, o la densidad óptica de la muestra y el fluoróforo de referencia debe de estar por debajo de este valor a la longitud de onda que se corresponde con la longitud de onda de excitación.

La eficiencia cuántica de una muestra desconocida se calcula aplicando la ecuación:

$$Q = Q_R \frac{I}{I_R} \frac{OD_R}{OD} \frac{n^2}{n_R^2}$$

**Ecuación 13**

donde  $Q$  es el rendimiento cuántico,  $I$  es la intensidad de fluorescencia integrada,  $OD$  es la densidad óptica o absorbancia, y  $n$  es el índice de refracción del medio. El subíndice  $R$  se refiere al fluoróforo de referencia de rendimiento cuántico conocido. En esta expresión se asume que la muestra y el patrón se excitan a la misma longitud de onda, por lo que no es necesario aplicar una corrección cuando se lleva a cabo la excitación a diferentes longitudes de onda.

En primer lugar se realiza una medida de absorbancia tanto de la muestra a caracterizar como del patrón que vamos a emplear, teniendo en cuenta a la hora de preparar la disolución que la absorbancia de ambas alícuotas debe ser inferior a 0,1 unidades a la longitud de onda de excitación de la muestra. A continuación se procede a medir la fluorescencia de esa misma alícuota de estándar, las mismas condiciones de medida (rendijas y voltaje) que se utilizan para registrar la fluorescencia de la muestras se utilizan para registrar el valor de la fluorescencia integrada (el área bajo la curva del espectro de fluorescencia) del patrón. Idealmente el paso de banda del monocromador de excitación debe tener el mismo valor que en espectrofotómetro utilizado para las medidas de absorbancia. Como el valor de  $Q_R$  lo conocemos por la bibliografía podemos aplicar la Ecuación 13, y calcular  $Q$ , el rendimiento cuántico de nuestra muestra.

En la elección del patrón adecuado se debe tener en cuenta que este absorba a la longitud de onda de excitación de elección para la muestra, y si es posible, que emita en una región similar a la región de emisión de la muestra que se pretende caracterizar. Una lista de patrones, con sus correspondientes rendimientos cuánticos, y rangos de emisión característicos se puede encontrar en la bibliografía<sup>9</sup>. Es necesario que el vidrio este escrupulosamente limpio y los disolventes empleados sean de grado espectroscópico. Una alternativa que da lugar a valores más precisos y exactos pero que es mucho más tediosa sería repetir el mismo procedimiento para cinco alícuotas de distinta concentración (absorbancia) tanto de estándar como de muestra, es decir, hacer una recta de calibrado.

En primer lugar hay que registrar el espectro de absorbancia de la muestra, en nuestro caso la disolución de QDs, y anotar el valor de la absorbancia a la longitud de onda de excitación. Seguidamente utilizando la misma cubeta de 10 mm de paso óptico

se registra el espectro de fluorescencia, y se calcula la intensidad de fluorescencia integrada. Se repite el mismo proceso con todas las alícuotas de la muestra y del patrón. Finalmente con los datos obtenidos se construye una recta de calibrado y se representa gráficamente el valor de la fluorescencia integrada frente a los valores de absorbancia. El resultado obtenido es una línea recta de pendiente  $m$  y ordenada en el origen cero. A partir de los valores de la pendiente para la muestra y para el estándar y aplicando:

$$Q = Q_R \frac{m}{m_R} \frac{n^2}{n_R^2}$$

**Ecuación 14**

Donde  $m$  es la pendiente de la recta del calibrado de la muestra, y  $m_R$  es la pendiente de la recta de calibrado del estándar, se puede obtener el valor del rendimiento cuántico  $Q$  para la muestra. Empleando este último procedimiento de calibrado de las muestras y el patrón se reduce el error en la determinación del valor del rendimiento.

### **C.3.8 Ensayo fluorimétrico para evaluar la presencia de radicales libres “hidroxilo” en disolución.**

La formación de radicales hidroxilo durante el proceso de irradiación de nanopartículas coloidales semiconductoras sometidas a un proceso de irradiación con luz UV puede ser monitorizada por medio de un ensayo fluorimétrico<sup>11</sup> específico para detectar la presencia de radicales hidroxilo. En dicho ensayo se hace uso del reactivo tereftalato de sodio, el cual reacciona en presencia de radicales hidroxilo, para formar el anión 2-hidroxitereftalato, que presenta emisión fluorescente con un máximo en torno a 425 nm en presencia de hidróxido de sodio<sup>12</sup>.

Para llevar a cabo dicho ensayo se empleó como posible muestra generadora de radicales hidroxilo una suspensión coloidal de QDs de CdSe/ZnS-P (QDs con núcleo de CdSe con un recubrimiento adicional de ZnS con la superficie modificada mediante la interacción con un polímero anfifílico PMA75C12). Dicha muestra se sometió a un proceso de irradiación continua con luz UV procedente de una lámpara (proceso fotoactivación) con un pico máximo de emisión en torno a 365 nm en presencia de tereftalato de sodio (no fluorescente). La formación de radicales hidroxilo durante el proceso en estudio, daría lugar a una reacción con el tereftalato presente en la muestra

para generar el 2-hidroxitereftalato, un compuesto que presenta fluorescencia en torno a los 425 nm (previa excitación a 320 nm) en presencia de hidróxido de sodio.

Se monitorizó la formación del 2-hidroxitereftalato registrando la emisión de fluorescencia a 425 nm a una longitud de excitación fija de 320 nm. En el ensayo se utilizaron 2,5 mL de la muestra de QDs de CdSe/ZnS-P (concentración estimada 3  $\mu$ M) junto con 2,5 mL de tereftalato de sodio (0,1 M en agua), y la mezcla final se sometió al proceso de fotoactivación con la lámpara de UV ( $\lambda = 365$  nm). Alícuotas de 500  $\mu$ L de la mezcla anterior se extrajeron de la mezcla a diferentes intervalos de tiempo, y se trataron con 250  $\mu$ L de NaOH 1 M. A continuación se procedió a la medida de la fluorescencia del 2-hidroxitereftalato a 425 nm (previa excitación a 320 nm), de forma simultánea también se registro la propia fluorescencia de la muestra de nanopartícula (en torno a 590 nm) para verificar el incremento de la emisión del QDs con el tiempo de irradiación.

### **C.3.9 Protocolo de medida de metales libres en disoluciones de quantum dots por ICP-MS.**

Se empleó la espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS: Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry) para la medida de la concentración de metales libres presentes en disolución coloidales de QDs de CdSe/ZnS-P sometidas a fotoactivación. Las medidas se llevaron a cabo con objeto de evaluar una posible liberación de los componentes que constituyen el núcleo de los QDs (Zn, Cd, Se) durante el proceso de fotoactivación. Los QDs pueden ser separados del disolvente por medio de un proceso de ultracentrifugación mediante filtros de membrana (Centricon, Amicon) como ya hemos descrito anteriormente C.3.5. Los filtros de membrana nos permiten obtener por un lado las nanopartículas de QDs-P, y por otro la disolución que contiene los posibles compuestos metálicos liberados a partir del proceso de degradación de la nanopartícula. La gran exactitud y precisión proporcionada por las medidas de ICP-MS puede arrojar luz sobre los procesos de degradación durante la fotoactivación.

Varias alícuotas de 2 mL (concentración estimada  $\sim 4$   $\mu$ M) de la muestra de CdSe/ZnS-P se sometieron a un proceso de irradiación continúa con luz ultravioleta durante intervalos de tiempo distintos (de 0 a 24 horas). Una vez las muestras se retiraban de la cámara de fotoactivación, se procedió a su centrifugación utilizando filtros de membrana Microcon Ultracel YM-100, hasta conseguir preconcentrar la



muestra hasta aproximadamente 0,5 mL. El exceso de sobrenadante se recogió para su posterior análisis mediante ICP-MS. Las nanopartículas poseen un elevado peso molecular ( $MW > 100$  kDa), por lo tanto durante el proceso de centrifugación tienden a concentrarse en la parte superior del filtro de membrana mientras que el exceso de disolvente cae hacia el vial que recoge el filtrado. Finalmente se procedió a la preparación de las muestras del exceso de sobrenadante para las medidas por ICP-MS. El tratamiento consistió en una dilución de la muestra (dilución 1:5 con  $HNO_3$  1%) utilizando Ga como patrón interno.

### **C.3.10 Síntesis de sol-geles dopados con quantum dots.**

Basándonos en estudios previos realizados en nuestro grupo de investigación<sup>13,14</sup>, se han utilizado originalmente los mismos precursores y proporciones, disolvente y catalizador que se recogen en tales trabajos con objeto de obtener sol-geles dopados con QDs. Inicialmente se utilizó como mezcla de silicatos precursores tetrametoxisilano (TMOS) y metiltrimetoxisilano (MTMOS), aunque tras optimizaciones posteriores se empleó finalmente como precursores tetrametoxisilano (TMOS) y 3-(aminopropil)triethoxisilano (APTES).

La disolución matriz del sol-gel se sintetiza por reacción entre una mezcla de Etanol,  $H_2O$ , NaOH y una disolución de QDs, con la mezcla de precursores (MTMOS/TMOS o APTES/TMOS) bajo agitación constante. A continuación comienza la etapa de polimerización y seguidamente la de secado (la disolución comienza a solidificarse inmediatamente después del proceso de mezcla) que se prolongará durante al menos dos semanas para eliminar los disolventes. Las proporciones básicas para llevar a cabo la síntesis de sol-geles consisten en mezclar 2,5 mL de EtOH, 4 mL de agua desionizada (en este volumen se incluye la disolución de quantum dots) y 50  $\mu$ L de NaOH 0,1 M (empleado como catalizador del proceso de polimerización). Tras agitar durante cinco minutos se añaden 750  $\mu$ L de TMOS y 750  $\mu$ L MTMOS (o 750  $\mu$ L de TMOS y 750  $\mu$ L APTES) los silicatos precursores. La mezcla se agita de nuevo y se deja que comienza el proceso de polimerización.

El sólido final o xerogel obtenido tras dos semanas de secado a temperatura ambiente se fragmenta en un mortero de ágata, y se clasifican las distintas fracciones del sólido obtenido por tamizado entre los tamaños de interés:  $< 80\mu m$ ,  $80\mu m-160\mu m$ ,  $160\mu m-200\mu m$ ,  $200\mu m-250\mu m$ ,  $250\mu m-300\mu m$ . Antes de llevar a cabo las medidas de fluorescencia es necesaria una etapa de fotoactivación de las nanopartículas atrapadas

en el interior de la matriz sólida mediante la exposición a la luz ultravioleta o luz natural de al menos dos días.

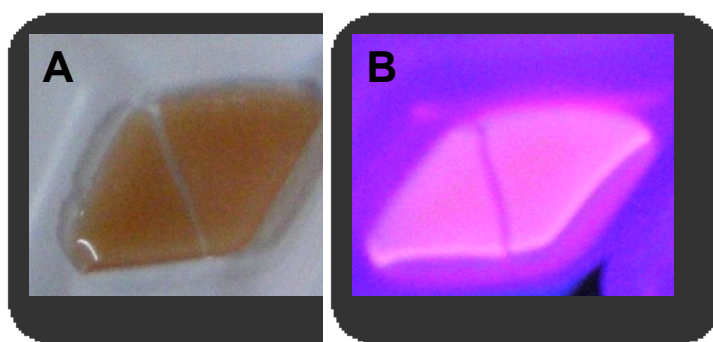
### **C.3.10.1 Procedimiento de síntesis de sol-gel con TMOS y MTMOS como precursores.**

Se mezclan 2,5 mL de etanol con 4 mL de agua desionizada (dentro de este volumen se incluye el volumen necesario de QDs solubles en medio acuoso: CdSe/ZnS-MES o CdSe/ZnS-P) y 50  $\mu$ L de hidróxido de sodio y se agita durante 5 minutos. A continuación se añaden 750  $\mu$ L de TMOS y 750  $\mu$ L MTMOS y se agita de nuevo la disolución. Tras el proceso de homogeneización, se inicia la polimerización de la mezcla y comienza la etapa de secado (dos semanas). Se seleccionó la fracción de 80-180 $\mu$ m para llevar a cabo los experimentos.

En el caso de sol-geles dopados con QDs CdSe/ZnS-TOP/TOPO dispersos en cloroformo, estos se dispersan directamente sobre la mezcla de silicatos precursores previamente a la polimerización.

### **C.3.10.2 Procedimiento de síntesis de sol-gel con TMOS y APTES como precursores.**

Bajo agitación constante y en el siguiente orden se añaden los reactivos: 2,5 mL de etanol se mezclan con 4 mL de agua desionizada (dentro de este volumen se incluye el volumen necesario de QDs CdSe/ZnS-P dispersos en disolución reguladora de SBB pH 12). A continuación se añaden 825  $\mu$ L de APTES, seguidos del volumen necesario de EDC en agua desionizada (en una proporción QD:EDC 1:1000), 675  $\mu$ L de TMOS y para finalizar 50  $\mu$ L de hidróxido de sodio 0,1 M. Tras la etapa de homogeneización se inicia la polimerización de la mezcla de reacción, e inmediatamente la etapa de secado (2 semanas). Una vez finalizada la etapa de tamizado se seleccionó la fracción de 80  $\mu$ m-180 $\mu$ m para experimentos posteriores.



**Figura 19.** Aspecto final xerogel poroso dopado con QDs bajo luz natural (A) y bajo irradiación con luz UV (B).

### C.3.10.3 Procedimiento de síntesis de sol-gel dopados con QDs y un aceptor.

Bajo agitación constante y en el siguiente orden se añaden los reactivos: 2,5 mL de etanol se mezclan con 500  $\mu\text{L}$  de la disolución del aceptor (en nuestro caso BCP: BromoCresol Purple) disuelto en agua desionizada, seguido de la adición de 200  $\mu\text{L}$  de QDs CdSe/ZnS-P dispersos en una disolución reguladora de SBB pH 12 (con objeto de alcanzar una concentración final de QDs en la mezcla final del orden de 0,1  $\mu\text{M}$ ). A continuación se añaden 3,3 mL de agua destilada, 825  $\mu\text{L}$  de APTES, inmediatamente se añade el EDC (en una proporción QD:EDC 1:1000), 675  $\mu\text{L}$  de TMOS y finalmente 50  $\mu\text{L}$  de hidróxido de sodio 0,1 M. Después del proceso de homogeneización, se inicia la polimerización de la mezcla y se somete al proceso de secado a temperatura ambiente durante dos semanas. El xerogel obtenido se fragmenta en un mortero de ágata y se selecciona la fracción de partículas de tamaño entre 80  $\mu\text{m}$ -180  $\mu\text{m}$  para estudios posteriores.

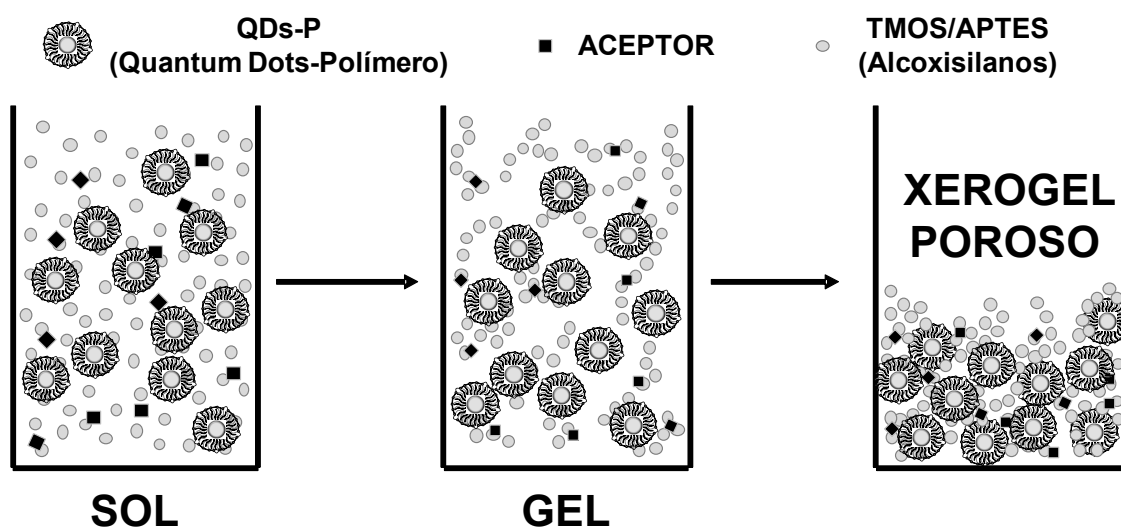


Figura 20. Esquema del proceso de preparación de un xerogel poroso dopado con QDs (donador) y un colorante sensible al pH (aceptor).

## C.3.11 Sistemas experimentales.

### C.3.11.1 Medidas fluorescencia

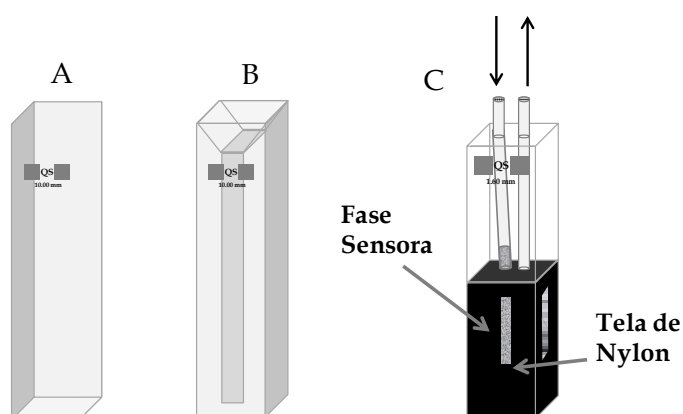
El sistema experimental empleado para la caracterización fotoluminiscente de las diferentes estructuras sol-gel dopadas con QDs, así como para el desarrollo de un sensor óptico basado en mecanismos de fluorescencia con transferencia de energía, consiste básicamente en una bomba peristáltica de cuatro canales Miniplus 2

(Scharlab), que genera un flujo de disolución portadora (disoluciones tampón a distintos pHs) fijado a 1 mL/min. Las canalizaciones empleadas en el sistema FIA son tubos de PTFE con un diámetro interno de 0,8 mm.

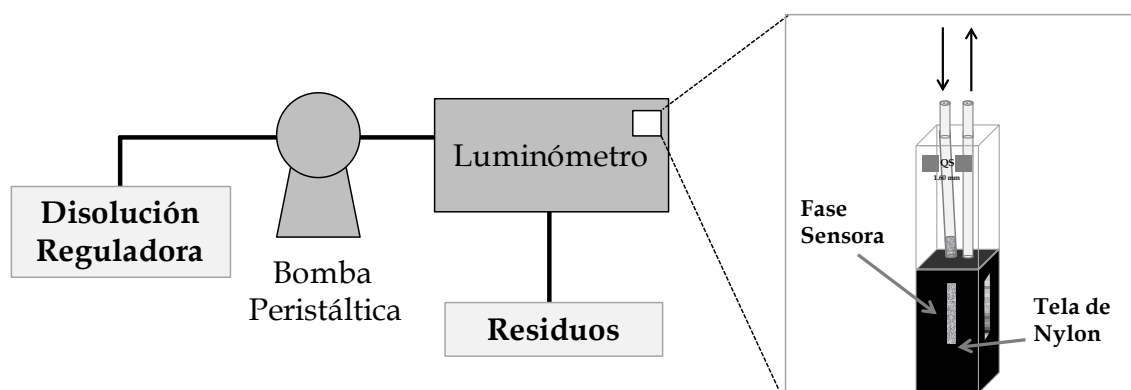
El soporte sólido sol-gel dopado con QDs una vez tamizado se empaqueta en una celda de flujo de luminiscencia Hellma modelo 176.052-QS (Mullhein, Alemania) con un paso óptico de 1,5 mm (Ver Figura 22), la cual se dispone en el compartimento de cubetas del luminómetro y se registran, a temperatura ambiente ( $20 \pm 3$  °C), las emisiones fotoluminiscentes del material empaquetado. Para asegurar que las partículas de sol-gel permanecen en el interior de la celda de flujo, es preciso colocar una tela de nylon en su interior pero asegurándonos que queda fuera del paso óptico. Este material que actúa como una especie de filtro, permite el paso de una disolución o un gas a su través y evita al mismo tiempo que la fase sea arrastrada.

Para llevar a cabo las medidas fluorescentes en discontinuo se emplea una celda de luminiscencia convencional de cuarzo Hellma (modelo 101 -QS) con un paso óptico de 10 mm, o en el caso de trabajar con volúmenes más pequeño se utilizará la celda de luminiscencia de menor volumen modelo 114F-QS (Ver Figura 21).

Las medidas de fluorescencia se llevaron a cabo con un espectrómetro de luminiscencia modelo Varian Cary Eclipse. Las variables instrumentales, incluyendo los anchos de las rendijas de excitación y emisión, voltaje del detector, etc., fueron debidamente optimizados en cada medida, a fin de obtener la mayor sensibilidad en la detección de la luminiscencia de los quantum dots evaluados.

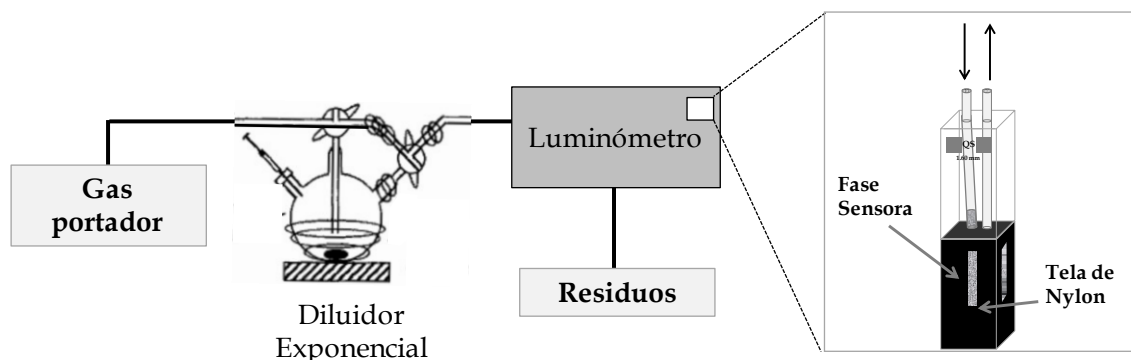


**Figura 21.** Esquema de las diferentes celdas de fluorescencia utilizadas: (A) 101-QS; (B) 114F-QS; (C) 176.052-QS.



**Figura 22.** Esquema del sistema FIA utilizado para la caracterización de las fases sensoras sol-gel.

En el caso de la fase sensora para la detección de compuestos orgánicos volátiles las medidas de fluorescencia se hicieron empleando el espectrómetro de luminiscencia Perkin Elmer modelo LS-50B. El sistema experimental empleado en este caso también es ligeramente distinto al empleado para la caracterización de los sol-gel, ya que se hace uso de un diluidor exponencial (Ver Figura 23).

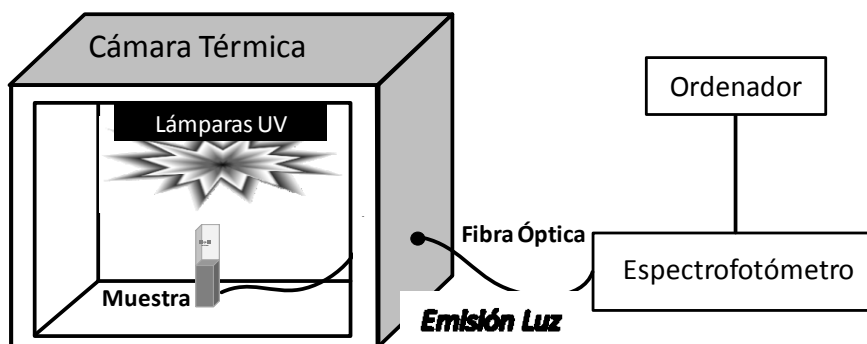


**Figura 23.** Esquema del sistema utilizado para el desarrollo de la fase sensora para la detección de compuestos orgánicos volátiles.

### C.3.11.2 Diseño experimental para el ensayo de fotoactivación de los quantum dots.

Se emplearon dos lámparas modelo F4 T5/BLB como fuentes de luz UV para el proceso de fotoactivación con objeto de alcanzar una distribución homogénea de luz para inducir cambios en la máxima de emisión alcanzada por las muestras de nanopartículas objeto de estudio. La lámpara de ultravioleta tiene un pico de emisión espectral centrado en 370 nm y una potencia de emisión de  $4,5 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ . La emisión de fluorescencia y la luz dispersada por la disolución coloidal de nanopartículas durante

el proceso de fotoactivación se conducen a un espectrómetro modelo USB 2000 (Ocean Optics) por medio de una fibra óptica. La fibra óptica encargada de captar la emisión luminiscente se coloca a un ángulo de 90 grados respecto a las lámparas utilizadas para la excitación. El conjunto formado por las lámparas de UV, la muestra y la fibra óptica se encuentra dentro de un incubadora (modelo ICP 500 Memmert) con objeto de mantener fija la temperatura alrededor de 20 °C, evitándose así la influencia de dicho factor durante el estudio. El sistema de medida adquiere la respuesta espectral a intervalos de tiempo concretos, que se pueden especificar en el programa de control del espectrómetro. En nuestro caso los intervalos de tiempo para la captura del espectro se establecieron en 10 minutos. Sin embargo, finalmente la duración de cada experimento de fotoactivación varía desde las 20 a las 200 horas dependiendo de la muestra que estemos evaluando. Cuando se finaliza el estudio de fotoactivación para cada muestra, los numerosos espectros de fluorescencia obtenidos a intervalos de tiempo de 10 minutos son procesados. La combinación de dichos espectros en un único gráfico nos proporciona una representación de la evolución de las señales ópticas con el tiempo. Además la representación de la longitud de onda del máximo de emisión o la intensidad del mismo frente al tiempo de irradiación son de gran utilidad a la hora de identificar el desplazamiento espectral o el incremento de la intensidad de fluorescencia durante el proceso de fotoactivación.



**Figura 24.** Esquema del diseño experimental empleado como cámara de fotoactivación.

#### C.4 REFERENCIAS.

<sup>1</sup> M. T. Fernández-Argüelles, J. M. Costa- Fernández, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, **Simple bio-conjugation of polymer-coated quantum dots with antibodies for fluorescence-based immunoassays**. *The Analyst*, 2008, 133, 444-447.

- <sup>2</sup> A. Peng, X. Peng, **Formation of High-Quality CdTe, CdSe, and CdS Nanocrystals Using CdO as Precursor**. *Journal of the American Chemical Society*, 2001, 123, 183-184.
- <sup>3</sup> R. E. Bailey, A. M. Smith, S. Nie, **Quantum dots in biology and medicine**. *Physica E*, 2004, 25, 1-12.
- <sup>4</sup> M. T. Fernández-Argüelles, A. Yakolev, R. A. Sperling, C. Luccardini, S. Gaillard, A. Sanz-Medel, J. Mallet, J. Brochon, A. Feltz, M. Oheim, W. J. Parak, **Synthesis and characterization of polymer-coated quantum dots with integrated acceptor dyes as FRET-based nanoprobe**s. *Nano Letters*, 2007, 7, 2613- 2617.
- <sup>5</sup> C-A. J. Lin, R. A. Sperling, J. K. Li, T-Y. Yang, P-Y. Li, M. Zanella, W. H. Chang, W. J. Parak, **Design of an amphiphilic polymer for nanoparticle coating and functionalization**. *Small*, 2008, 4 (3), 334-341.
- <sup>6</sup> M. T. Fernández-Argüelles, J. M. Costa-Fernández, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, **Surface-modified CdSe quantum dots for the sensitive and selective determination of Cu (II) in aqueous solutions by luminescent measurements**. *Analytica Chimica Acta*, 2005, 549, 20-25.
- <sup>7</sup> W.J. Jin, M.T. Fernández-Argüelles, J.M. Costa-Fernández, R. Pereiro, A.Sanz-Medel, **Photoactivated luminescent CdSe quantum dots as sensitive cyanide probes in aqueous solutions**. *Chemical Communications*, 2005, 883-885.
- <sup>8</sup> W. W. Yu, L. Qu, W. Guo, X. Peng, **Experimental determination of the extinction coefficient of CdTe, CdSe and CdS nanocrystals**. *Chemistry of Materials*, 2003, 15, 2854-2860.
- <sup>9</sup> J. R. Lakowicz, **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. Third Edition, 2006, Springer. Singapore.
- <sup>10</sup> J. N. Demas, G. A. Crosby, **The measurement of photoluminescence Quantum Yields. A Review**. *The Journal of Physical Chemistry*, 1971, 75 (8), 991-1024.
- <sup>11</sup> V. Rajendran, M. Lehnig, C. M. Niemeyer, **Photocatalytic activity of colloidal CdS nanoparticles with different capping ligands**. *Journal of Materials Chemistry*, 2009, 19, 6348-6353.
- <sup>12</sup> B. I. Ipe, M. Lehnig, C. M. Niemeyer, **On the generation of free radical species from Quantum Dots**. *Small*, 2005, 1, 7, 706-709.
- <sup>13</sup> I. Sánchez- Barragán, J. M. Costa-Fernández, A. Sanz-Medel, **Tailoring the pH response range of fluorescent-based pH sensing phases by sol-gel surfactants co-immobilization**. *Sensors and Actuators B*, 2006, 107, 69-76.
- <sup>14</sup> J. M. Costa-Fernández, M. E. Diaz-García, A. Sanz-Medel, **Sol-gel immobilized room-temperature phosphorescent metal-chelate as luminescent oxygen sensing material**. *Analytica Chimica Acta*, 1998, 360, 17- 26

## **D. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**





## D.1 ESTRATEGIAS DE SOLUBILIZACIÓN DE QUANTUM DOTS EN MEDIO ACUOSO: ESTUDIO COMPARATIVO

### D.1.1 Antecedentes y objetivos parciales.

Tal y como se ha recogido en la introducción los QDs son un tipo de nanopartícula que posee unas propiedades espectroscópicas especiales y ventajosas frente a los colorantes orgánicos tradicionales<sup>1</sup> lo cual los hace especialmente atractivos como una nueva generación de marcadores fotoluminiscentes con aplicación en numerosas aplicaciones biomédicas. o bioanalíticas. El empleo de este tipo de nanopartículas como marcadores no solo puede ayudar a solventar alguno de los problemas típicos que presentan los colorantes fluorescentes, sino que permite ampliar considerablemente el campo de aplicación de este tipo de sistemas fotoluminiscentes. Por ello, durante los últimos años se ha detectado un creciente interés en la síntesis, modificación superficial y empleo de los Quantum Dots como marcadores luminiscentes directos o indirectos con gran potencial en multitud de aplicaciones en bioanálisis.

En efecto, los QDs son un tipo de nanopartícula coloidal que presenta un espectro de absorción muy amplio que se incrementa hacia longitudes de onda cortas, tienen una intensa emisión fluorescente, elevada fotoestabilidad y tiempos de vida largos. Sin embargo, sin duda la propiedad más explotada de los QDs reside en la posibilidad de modular la emisión fluorescente en función del tamaño de partícula. Además presentan perfiles de emisión fluorescente simétricos y estrechos, cuya anchura está condicionada por la distribución de tamaños de QD. En este contexto hay que señalar que las propiedades ópticas de estas nanopartículas coloidales dependen de factores como: la composición del núcleo, el tamaño de partícula, la distribución de tamaños y la química de su superficie. Parámetros como el rendimiento cuántico de la fluorescencia  $Q$  (*Quantum Yield*) o su estabilidad están íntimamente relacionados con el número de enlaces incompletos sobre la superficie del núcleo.

En efecto las propiedades luminiscentes de los QD están altamente condicionadas por el estado de la superficie de la nanopartícula, por lo que cualquier tipo de modificación sobre la estructura nativa de la nanopartícula o su entorno puede crear nuevos defectos superficiales o eliminar los ya existentes. Estos defectos

superficiales son los responsables de posibles desactivaciones no radiacionales de la luminiscencia, y por lo tanto de la reducción del rendimiento cuántico de este tipo de nanopartículas. Por todo esto, cualquier modificación de la superficie del núcleo, ya sea mediante la adición de una capa adicional de un semiconductor (*shell*), o mediante el recubrimiento con ligandos orgánicos puede provocar cambios muy importantes en las propiedades ópticas del nanomaterial.

A pesar de que existen rutas sintéticas que proporcionan QDs ya solubles en medios acuosos, los QDs de mayor calidad se obtienen mediante protocolos de síntesis que tienen lugar en disolventes orgánicos a elevada temperatura. Los QDs así obtenidos son estables en medio coloidal gracias a la generación de un recubrimiento superficial con moléculas hidrofóbicas (p. ej. fosfinas) que minimizan posibles interacciones entre nanopartículas y su eventual agregación.

Estos QDs son estables en medios orgánicos, sin embargo es preciso modificar posteriormente las nanopartículas hidrofóbicas para obtener QDs solubles en medio acuosos, y por tanto biocompatibles, intentando no degradar las propiedades ópticas de las nanopartículas durante el proceso de solubilización. Las dos vías principales para abordar el proceso de solubilización en medio acuoso consisten en:

-El *intercambio de ligandos* consiste en reemplazar el recubrimiento de ligandos hidrofóbicos originales por moléculas bifuncionales que poseen un grupo funcional con afinidad por la superficie del QD (p. ej. un grupo tiol -SH) y en el otro extremo un grupo funcional que proporciona la solubilidad en medio acuoso (p. ej. un grupo carboxilo -COOH o un grupo sulfónico -SO<sub>3</sub>H).

-El *recubrimiento con polímeros anfifílicos*. En este procedimiento el polímero anfifílico se une al recubrimiento hidrofóbico original de la nanopartícula a través de las interacciones hidrofóbicas entre sus cadenas y las cadenas hidrofóbicas que rodean el núcleo de la nanopartícula. De esta forma los grupos hidrofílicos del polímero quedan orientados hacia el exterior proporcionando la buscada solubilidad en medio acuoso. Un inconveniente asociado a esta vía de solubilización surge por el incremento del tamaño del QDs, lo que puede ser una desventaja para algunas bioaplicaciones.

Pronosticar la influencia del entorno o del tipo de funcionalización sobre las propiedades ópticas de los QDs es una tarea compleja. Los espectros de excitación y de emisión no suelen verse tan afectados por la modificación, como el rendimiento cuántico o el proceso de decaimiento. Sin embargo, algunos factores del microentorno como la polaridad de la propia matriz, la disponibilidad de enlaces hidrógeno,

viscosidad, pH y la fuerza iónica, así como la presencia de tensoactivos o desactivantes de la fluorescencia como el oxígeno, o moléculas conjugadas pueden tener una gran influencia en los parámetros ópticos. Además, la composición química de la disolución reguladora puede conducir a la inestabilidad de los QDs debido a modificaciones de la carga o la química superficial de la nanopartícula provocando la agregación parcial o completa de la muestra de QDs. La estabilidad a largo plazo de estas nanopartículas es uno de los puntos clave para ciertas aplicaciones, p. ej. marcadores biomédicos, de ahí la necesidad de estudiar la estabilidad de la unión nanocristal-ligando.

Por todo ello el **objetivo** a abordar en este capítulo consiste en la síntesis de nanopartículas semiconductoras coloidales siguiendo una ruta sintética en medio orgánico y la posterior modificación de su superficie con el fin de hacerlas solubles en medios acuosos a través de diferentes vías. Se evaluará de forma comparativa la evolución de las propiedades de las nanopartículas en función del tipo de núcleo y del recubrimiento hidrosoluble. A lo largo de este capítulo se evaluará la compatibilidad de QDs sintetizados con diferente química superficial en distintas disoluciones reguladoras durante largos periodos de tiempo (p. ej. varios días o meses). Los resultados obtenidos nos ofrecerán información de utilidad con objeto de escoger los QDs más apropiados para optimizar el proceso de almacenaje, en aplicaciones de los QDs a largo plazo, en el desarrollo de sensores sensibles o ensayos que empleen QDs como marcadores fluorescentes.

### D.1.2 Tipo de nanopartículas estudiadas.

Las nanopartículas utilizadas a lo largo de los estudios se sintetizaron en nuestro laboratorio siguiendo el procedimiento descrito en el *epígrafe C.3.1*. Como hemos dicho los QDs de mejor calidad son aquellos que se obtienen cuando la síntesis tiene lugar a elevadas temperaturas en un disolvente orgánico coordinante, en nuestro caso HPA, TOP y TOPO. Estos compuestos orgánicos, que recubren y estabilizan la superficie de la nanopartícula, determinan la solubilidad de la partícula en el medio orgánico y previenen posibles agregaciones de los nanocristales. En este tipo de síntesis la nucleación de los nanocristales tiene lugar de forma rápida, seguida de una etapa de crecimiento. Una vez alcanzado el tamaño de partícula deseado (podemos monitorizar las características espectroscópicas mediante la extracción de alícuotas del medio de reacción) se puede detener el crecimiento de las nanopartículas bajando la temperatura de la mezcla de reacción. Todo el proceso tiene que llevarse a cabo en atmósfera inerte

debido a la reactividad de los precursores en presencia de humedad u oxígeno, pero una vez sintetizados los QDs son estables al aire, lo que facilita su manipulación posterior<sup>2</sup>. Los QDs pueden estar compuestos por materiales semiconductores binarios o ternarios, pero de todas las posibilidades son sin duda los QDs con núcleo de CdSe y CdSe/ZnS los más estudiados y empleados en la mayoría de las aplicaciones bioanalíticas desarrolladas hasta la fecha.

En el caso de que pretendamos obtener nanopartículas con núcleo de CdSe se eliminará la etapa de adición de la mezcla Zn/S/TOP que propicia el crecimiento de la capa adicional de ZnS. Las condiciones experimentales y reactivos añadidos en la síntesis descrita aseguran la obtención de nanopartículas monodispersas y estables. En el caso de la síntesis de QDs con núcleo de CdSe/ZnS se consigue una mejora en la estabilidad luminiscente de los QDs generando una capa de material semiconductor con mayor energía de banda, ZnS, alrededor de la superficie del nanocrystal debido a la pasivación de la superficie. Se genera así el sistema “core-shell” o “núcleo-recubrimiento”<sup>3</sup>.

Es importante señalar que para que los QDs tengan utilidad analítica, estos deben poseer un elevado rendimiento cuántico de la luminiscencia, presentar estabilidad de las propiedades luminiscentes en condiciones reales de medida, y ser solubles en el medio de interés. A pesar de que el recubrimiento con otro semiconductor inorgánico ofrece una mejora significativa, no es la solución definitiva. En efecto, se ha observado que el rendimiento cuántico de la fluorescencia no es del 100%, es decir, una fracción significativa de nanopartículas se encuentran permanentemente sin emitir luminiscencia<sup>4</sup>. Las nanopartículas núcleo-recubrimiento siguen sufriendo procesos de foto-oxidación o fotoactivación típicos de los QDs de núcleo simple. La fotoluminiscencia de un quantum dot de CdSe/ZnS también exhibe fluctuaciones en la intensidad y el espectro, atribuidos a la existencia de canales de carga en la superficie de la nanopartícula.

### **D.1.3 Discusión de los resultados.**

#### **D.1.3.1 Muestras empleadas en el estudio comparativo**

A lo largo de este capítulo se ha estudiado el comportamiento de muestras de QDs con núcleo de CdSe o tipo núcleo-recubrimiento CdSe/ZnS con tres tipos diferentes de ligandos para modificar su superficie: ácido mercaptoacético (QDs-MAA) y ácido 2-mercaptoetanosulfónico (QDs-MES) en la modificación mediante intercambio

de ligandos, y un polímero anfifílico PMA75C12 (QDs-P) en la segunda vía. Los QDs fueron sintetizados en el laboratorio y posteriormente modificados siguiendo los procedimientos experimentales C.3.1 *Síntesis de quantum dots*, C.3.3 *“Modificación de la superficie de los quantum dots por un proceso de intercambio de ligandos.”* , C.3.4 *“Modificación de la superficie de los quantum dots por interacción con polímero anfifílico.”* . La disolución reguladora utilizada para la dispersión final de los QDs una vez modificados con los ligandos bifuncionales varía en función del pH final de la disolución que deseamos obtener, en este caso trabajaremos con los pH 5, 7,4, 9 y 12 (SBB 50 mM pH 12 y pH 9; PBS 50 mM pH 7.4; and HAc/NaAc 50 mM pH 5) utilizando las disoluciones reguladoras correspondientes. La descripción detallada de las muestras evaluadas es la siguiente:

**CdSe-MAA:** dispersiones de QDs con núcleo de CdSe modificados mediante la vía de intercambio de ligandos con ácido mercaptoacético.

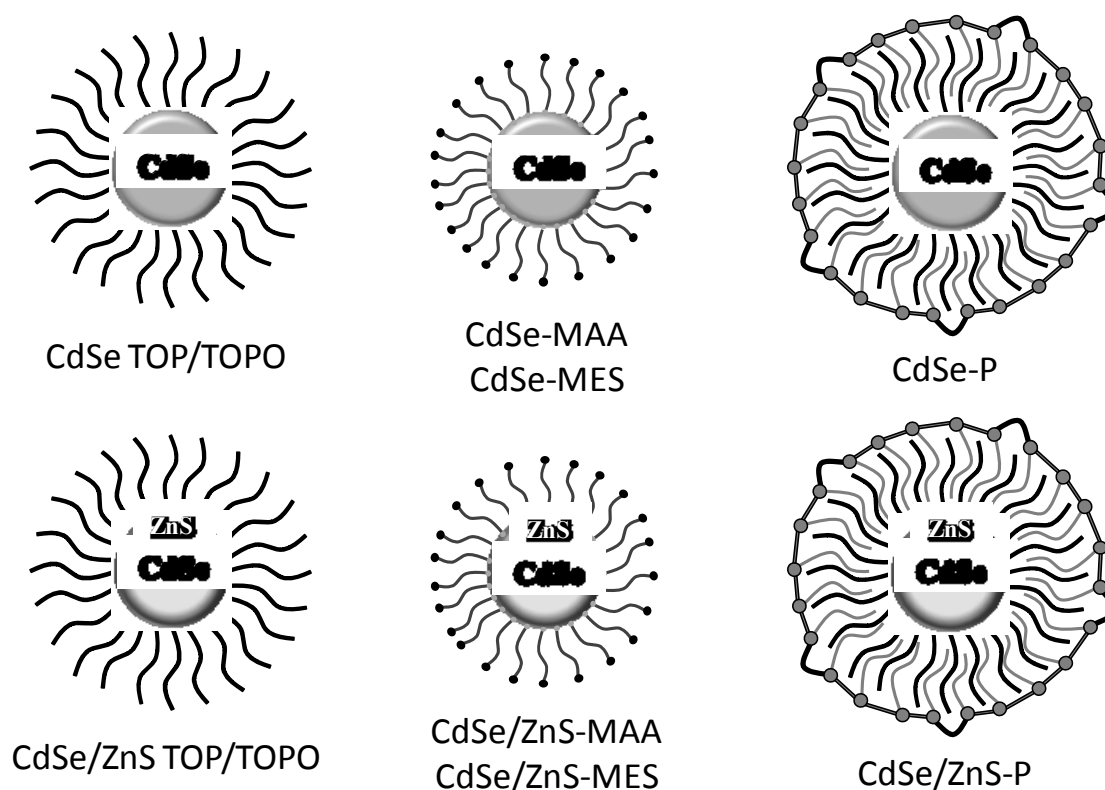
**CdSe/ZnS-MAA:** dispersiones de QDs con núcleo de CdSe con un recubrimiento adicional de ZnS modificados mediante la vía de intercambio de ligandos con ácido mercaptoacético.

**CdSe-MES:** dispersiones de QDs con núcleo de CdSe modificados mediante la vía de intercambio de ligandos con ácido 2-mercaptoetanosulfónico.

**CdSe/ZnS-MES:** dispersiones de QDs con núcleo de CdSe con un recubrimiento adicional de ZnS modificados mediante la vía de intercambio de ligandos con ácido 2-mercaptoetanosulfónico.

**CdSe-P:** dispersiones de QDs con núcleo de CdSe modificados mediante interacción con polímero anfifílico PMA75C12.

**CdSe/ZnS-P:** dispersiones de QDs con núcleo de CdSe con un recubrimiento adicional de ZnS modificados mediante interacción con polímero anfifílico PMA75C12.



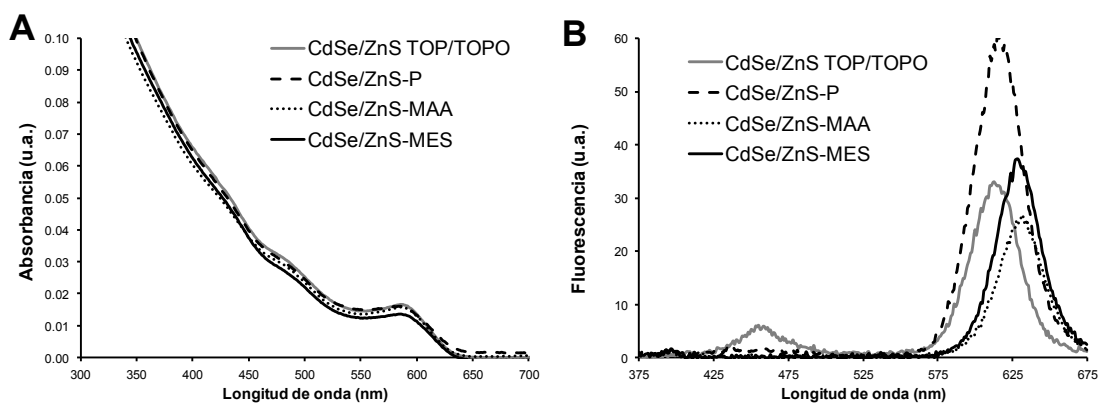
**Figura 25.** Representación esquemática de las diferentes muestras de QDs empleadas a lo largo del estudio comparativo.

Además, los distintos QDs estudiados han sido dispersados en disoluciones de pH 5, 7,4, 9 y 12.

#### D.1.3.2 Caracterización de los QDs.

Tanto tras el proceso de síntesis como el proceso de solubilización se hace uso de la espectrofotometría de absorción molecular ultravioleta-visible (UV-Vis), que además de ser necesaria para estimar la concentración de nanopartículas en una determinada disolución, junto con la espectroscopia de fluorescencia molecular nos permite comprobar que no existe variación significativa de las propiedades ópticas tras el proceso de solubilización en medio acuoso como se observa en la Figura 26.

También por medio de medidas de absorbancia (*Ver C.3.6*) se puede estimar el tamaño de las nanopartículas empleadas, en este caso el diámetro del núcleo se encuentra en torno a los 3,9 nm para los QDs de CdSe/ZnS, lo que equivale a una emisión luminiscente centrada en 610 nm. La estimación de la concentración y del tamaño de las nanopartículas se lleva a cabo mediante medidas espectrofotométricas<sup>5</sup>.



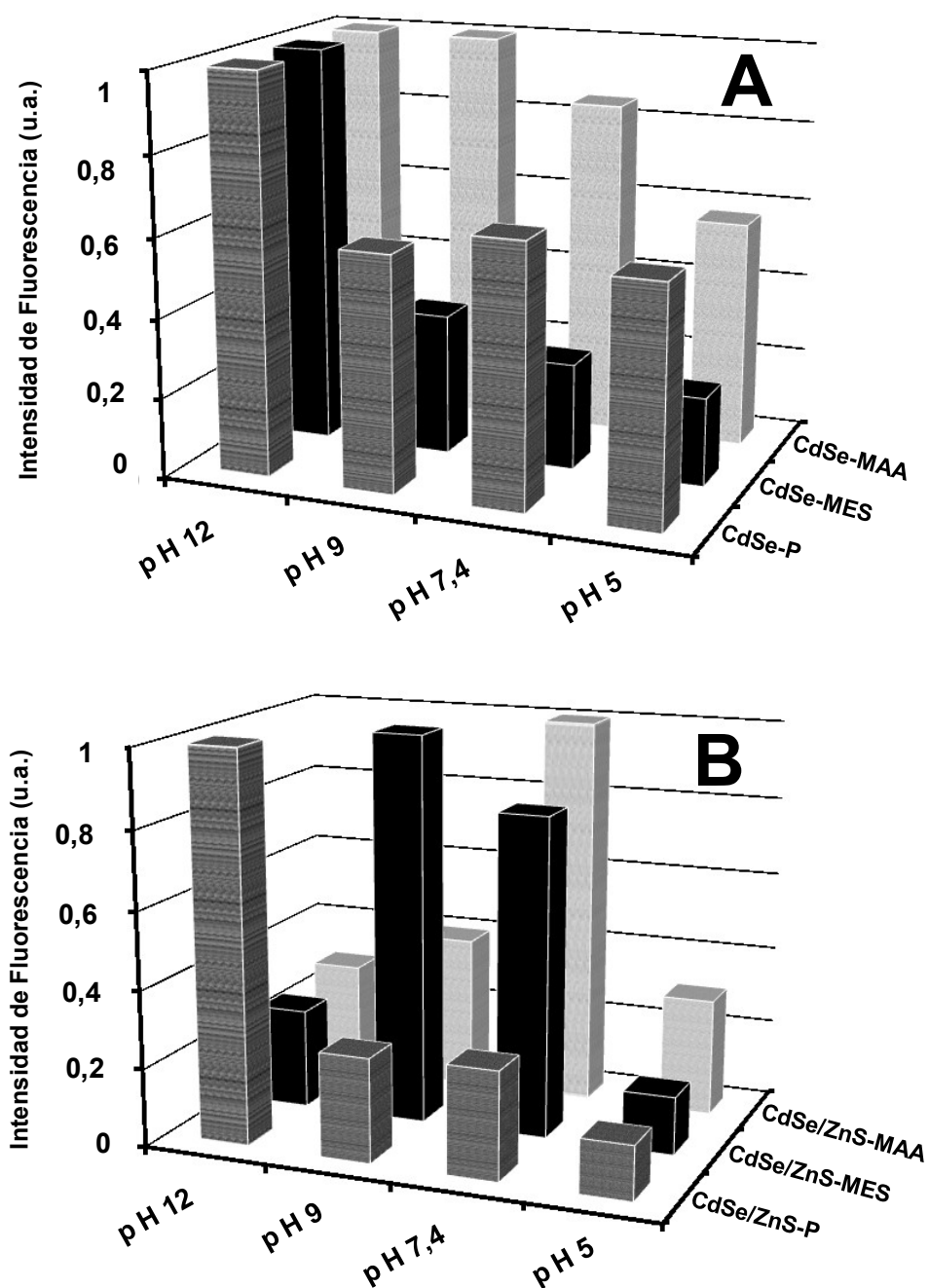
**Figura 26.** Espectros de A) absorbancia y B) fluorescencia de distintas muestras de QD con núcleo de CdSe antes y después de ser sometidas al proceso de solubilización.

#### D.1.3.3 Efecto del pH del medio sobre la intensidad de luminiscencia y el estado de agregación de los QDs

Con objeto de evaluar la modificación superficial que proporciona quantum dots más estables y menos afectados por el pH del medio se registraron las señales de emisión de fluorescencia de todas las muestras de QDs descritas anteriormente. Hay que señalar que además se evaluarán variaciones en la emisión fluorescente de las disoluciones coloidales en función del tiempo transcurrido tras su síntesis.

Todas las muestras se prepararon asegurando una concentración estimada de nanopartículas en torno a 1  $\mu\text{M}$ , concentración estimada de acuerdo con la ecuación propuesta por Peng<sup>5</sup> (Ver protocolo en la sección C.3.6). Las señales de fluorescencia de las disoluciones coloidales fueron registradas bajo las mismas condiciones experimentales ( $\lambda_{\text{exc}} = 350 \text{ nm}$ , Rendijas 10/10 nm, y 600 V) el primer día que se llevo a cabo la modificación de las muestras y cada 24 horas durante los siguientes siete días. La emisión de fluorescencia en los QDs es una consecuencia de la generación de un excitón (par  $e^-/h^+$ ) cuando son irradiados por luz ultravioleta. Por lo tanto, la luminiscencia observada se genera en el núcleo de CdSe en este caso, y está significativamente afectada por el entorno. En el caso de los QDs CdSe/ZnS el núcleo se considera que está más protegido, y por tanto presentará una emisión más intensa, y se espera que sea más estable y este menos afectada por el pH o la modificación superficial.

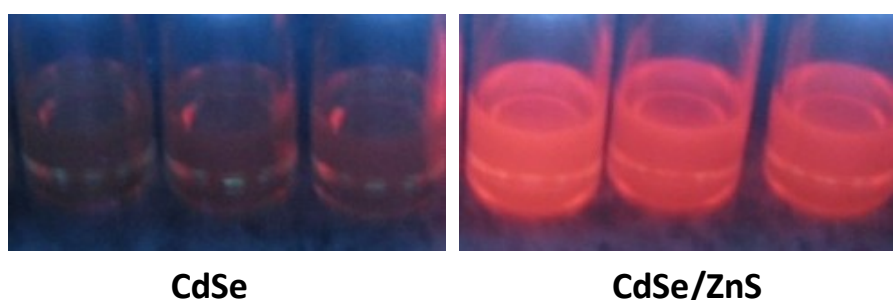




**Figura 27.** Efecto del pH sobre la intensidad de luminiscencia de QDs de CdSe (A) y CdSe/ZnS (B) con diferente modificación superficial.

En la Figura 27 A se observa una progresiva reducción de la emisión de luminiscencia de los QDs de CdSe a medida que disminuye el pH del medio. Este efecto es especialmente acusado en el caso de los QDs CdSe-MES. Cuando se compara este comportamiento con los resultados obtenidos en el caso de disoluciones coloidales de QDs de CdSe/ZnS, de nuevo se observa, de modo general, una mayor intensidad

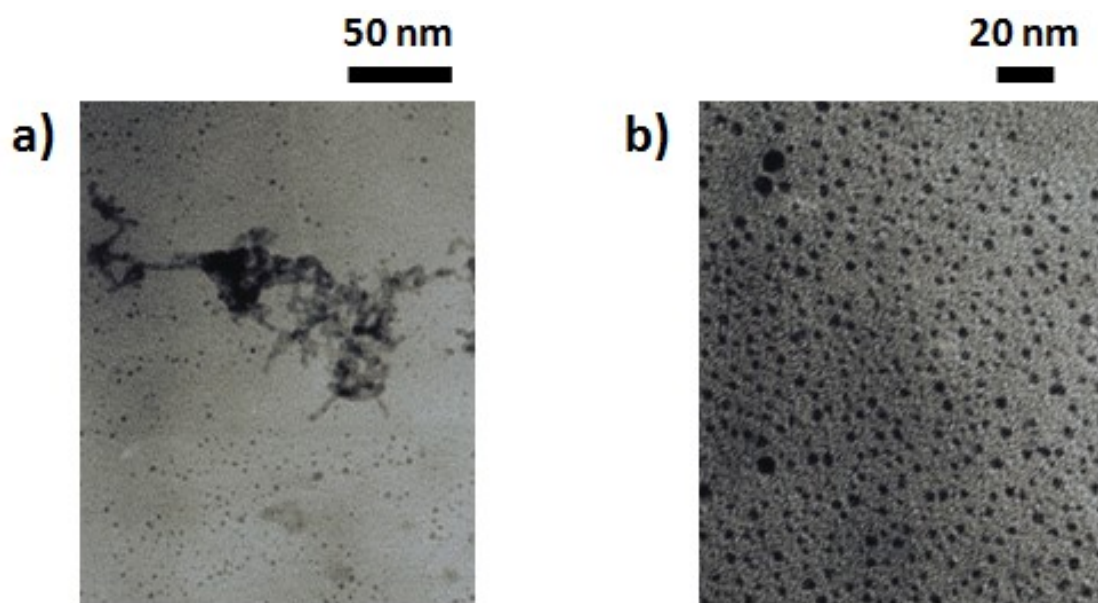
de fluorescencia cuando los QDs se encuentran en medios de pH básicos. Hay que señalar que los valores de intensidades de emisión representados en los gráficos de la Figura 27 son intensidades normalizadas. De ahí que, a pesar de que a la vista de los resultados representados en la Figura 27 podría parecer que las máximas señales de emisión se obtienen en caso de los QDs de CdSe, la realidad es que los QDs de CdSe presentan una intensidad de emisión mucho menor que los QDs CdSe/ZnS. En efecto, tal y como se observa en las fotografías de la Figura 28, los QDs de CdSe que tienen una capa adicional de ZnS presentan una intensidad de emisión luminiscente muy superior a la de los mismo QDs de CdSe (a similar concentración y ligando orgánico protegiendo la superficie) pero sin el recubrimiento adicional de ZnS.



**Figura 28.** Fotografías de viales de vidrio que contienen suspensiones coloidales de CdSe y CdSe/ZnS QDs en cloroformo iluminadas con luz UV.

Por otro lado, hay que señalar que, tal y como se deduce de la Figura 27, aunque los QDs de núcleo de CdSe se sintetizan con una capa adicional de ZnS, su intensidad de fluorescencia está afectada de forma significativa por el pH del medio, probablemente debido a procesos de protonación/desprotonación de las capas circundantes del recubrimiento.

Este proceso influye en la estabilidad coloidal de los QDs. Como se observa en la Figura 27B, la mayor intensidad de fluorescencia de los QDs tipo core/shell modificados con MAA mediante intercambio de ligandos se alcanza a pH 7,4, mientras que el máximo de intensidad para los QDs CdSe/ZnS-MES se alcanza a pH 9, no obstante, a pH 7,4 se observa una elevada señal de fluorescencia. Por otro lado, en ambos casos tiene lugar un drástico decrecimiento de la luminiscencia en medio ácido que puede ser atribuido a la liberación de ligandos de la superficie del QD, y favoreciéndose así el proceso de agregación de nanopartículas, lo que se traduce en la precipitación de las nanopartículas y la consiguiente disminución de la intensidad de la fluorescencia.



**Figura 29.** Imágenes de microscopía de transmisión electrónica de QDs coloidales solubles en medio acuoso tomada un mes después de la síntesis. A) QDs-MAA; B) QDs-P.

La interacción entre los ligandos superficiales y los cationes sobre la superficie de la nanopartícula puede ser considerada como un tipo especial de enlace de coordinación. En el caso de los CdSe/ZnS-MES y CdSe/ZnS-MAA, los protones del entorno que rodea la nanopartícula compiten por los ligandos bifuncionales por la superficie de la nanopartícula<sup>6</sup>. Por lo tanto, a pHs ácidos se favorece la liberación de los ligandos bifuncionales de la superficie del nanocrystal como resultado de una reacción de desplazamiento, que destruye la homogeneidad de la disolución y provoca la agregación de nanopartículas. La desorción de estos ligandos tiolados conduce a una disminución de la carga total negativa de la nanopartícula, con lo que se reduce la repulsión electrostática entre nanopartículas. Así, a pHs ácidos puede tener lugar de forma espontánea la agregación de CdSe/ZnS-MAA y CdSe/ZnS-MES. Cuando la desorción de los ligandos tiene lugar se generan grandes agregados de nanopartículas, una vez alcanzan un cierto tamaño, precipitan en la disolución lo que conduce a una disminución de la fluorescencia medida de la disolución coloidal contenida en la cubeta. Además, la pérdida de esta capa de ligandos puede causar posibles problemas citotóxicos, haciendo al nanocrystal extremadamente tóxico.

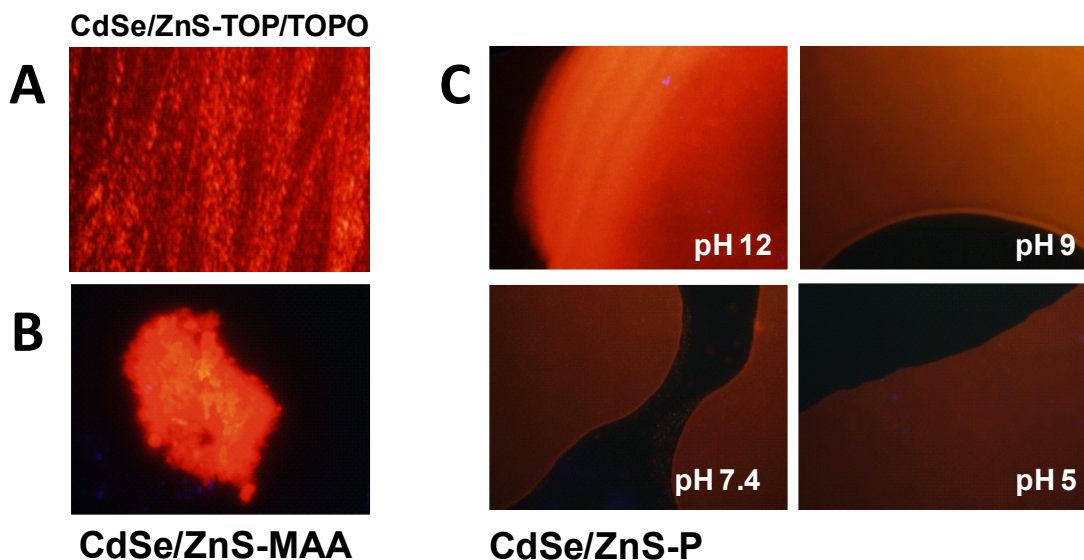
Por el contrario, a pH básicos la afinidad de unión de los grupos que estabilizan la nanopartícula por el Zn está más favorecida, debido a la desprotonación de los grupos alquiltioles (pKa en torno a 10,3 para el MAA y 10,5 para el MES), los cuales tendrán carga negativa favoreciéndose así la coordinación entre los ligandos y la

superficie del semiconductor. Este hecho repercutirá en una mejora de la dispersabilidad de las nanopartículas y el rendimiento cuántico (como se verá en el siguiente apartado).

Los QDs estabilizados con un recubrimiento polimérico (QDs-P) presentan una tendencia similar a los solubilizados mediante intercambio de ligandos, ya sean QDs con núcleo de CdSe o de CdSe/ZnS. En ambos casos el máximo de emisión de fluorescencia se alcanza a cuando los QDs se encuentran a pH 12, aunque la intensidad de fluorescencia se reduce significativamente a medida que disminuye el pH del medio. Esta reducción puede deberse al procedimiento experimental que se sigue para preparar las disoluciones en medios más ácidos de QDs-P, el cual implica un protocolo adicional de preconcentración (*Ver procedimiento experimental en sección C.3.5*) mediante ultracentrifugación. Cuanto más bajo es el pH final de la disolución que queremos alcanzar, mayor es el número de etapas de centrifugación a las que es preciso someter a los QDs. En este sentido, el número de moléculas de TOPO unidas a la superficie del QD después de varias etapas de centrifugación será significativamente menor que en el buffer original SBB pH 12.

Adicionalmente, se empleó un microscopio de fluorescencia con objeto de evaluar la estabilidad coloidal de las distintas nanopartículas sintetizadas y modificadas en el laboratorio a distintos pHs. El empleo del microscopio de fluorescencia permitió obtener imágenes de las diferentes muestras de QDs depositados sobre portaobjetos. Como se puede observar en la Figura 30, los QDs de CdSe/ZnS en disolvente orgánico no están agregados, ya que el proceso de encendido y apagado de los QDs (*"blinking"*) se puede observar. Sin embargo, los QDs CdSe/ZnS-MAA y CdSe/ZnS-MES, modificados mediante intercambio de ligandos presentan una gran cantidad de agregados de nanopartículas a todos los pHs evaluados. Por otro lado, estos problemas de agregación no se observan aparentemente cuando la muestra de CdSe/ZnS-P se observa bajo el microscopio, incluso varios meses después de llevar a cabo el proceso de modificación con polímero anfifílico. Este hecho se debe probablemente a que en la modificación con el polímero se conservan los ligandos originales que recubren la nanopartícula, es decir, se retiene la estructura nativa original, evitándose así la agregación parcial que tiene lugar durante el procedimiento de intercambio de ligandos. Además las interacciones hidrofóbicas entre las cadenas alquílicas del polímero con los ligandos hidrofóbicos superficiales de TOPO, y la estructura final del polímero está estabilizada con un entrecruzador, el cual

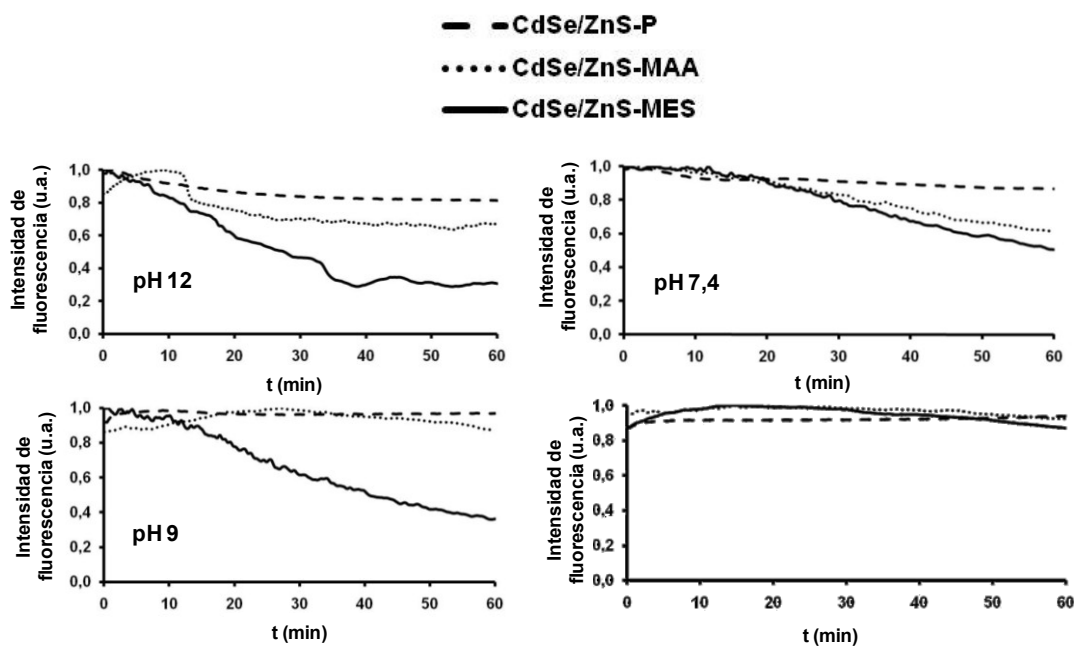
proporciona una elevada estabilidad coloidal a la estructura final, especialmente si lo comparamos con los QDs obtenidos mediante intercambio de ligandos donde la disociación y re-coordinación tiene lugar más fácilmente.



**Figura 30.** Imágenes de QDs CdSe/ZnS en medio orgánico (A) de QDs CdSe/ZnS-MAA de pH 12 (B) y de de QDs CdSe/ZnS-P (C) a distintos pHs obtenidas mediante microscopía de fluorescencia.

#### D.1.3.4 Estabilidad temporal de los QDs hidrosolubles.

Habitualmente, los fluoróforos orgánicos presentan una estabilidad luminiscente reducida, ya que incluso en cuestión de unos pocos minutos pueden sufrir una pérdida súbita (*photobleaching*) de luminiscencia cuando se someten a un proceso de iluminación. Alternativamente, los QDs son unos fluoróforos más robustos desde el punto de vista de fotoestabilidad porque presentan una emisión estable bajo irradiación continua, lo que los convierte en una interesante alternativa a los fluoróforos convencionales. Sin embargo, a pesar de sus beneficiosas propiedades como fluoróforos los QDs están afectados por el entorno, y tampoco existe un gran consenso sobre la selección de las condiciones más adecuadas para alcanzar los QDs con mejores propiedades. De este modo, el objetivo de este estudio fue evaluar la estabilidad de la señal de los QDs con diferentes modificaciones superficiales bajo irradiación continua para condiciones de análisis de rutina a diferentes pHs.

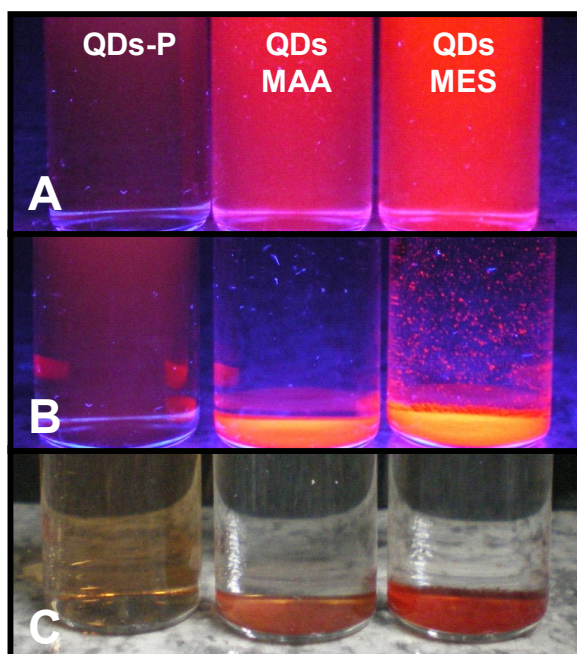


**Figura 31.** Estabilidad de la emisión de luminiscencia de los QDs con diferente modificación superficial frente al tiempo de irradiación a diferentes pHs.

Los estudios experimentales se realizaron a pH diferentes, usando las mismas disoluciones reguladoras que hemos empleado en los estudios anteriores. Los QDs fueron sometidos a un proceso de irradiación a una longitud de onda de excitación de 350 nm con una lámpara de Xe en un fluorímetro Varian Cary Eclipse durante 60 minutos. Los espectros de fluorescencia fueron registrados a temperatura ambiente. Los resultados obtenidos se recogen en la Figura 31, donde se puede observar que los QDs de CdSe/ZnS-MAA y CdSe/ZnS-MES presentan la menor estabilidad en su señal de fluorescencia debido probablemente a los procesos de agregación que tienen lugar. Se observa un continuo decrecimiento de la señal luminiscente como consecuencia del gran tamaño de los agregados, el cual se acentúa a medida que aumenta el pH del medio, especialmente en el caso de los CdSe/ZnS-MES QDs. Por otro lado los QDs CdSe/ZnS-P presentan un decrecimiento poco significativo de la luminiscencia cuando se someten al mismo proceso de irradiación incluso a pHs ácidos. De hecho, como se observó anteriormente, la estabilidad de la luminiscencia de los QDs modificados con polímero es mayor que aquellos modificados con ligandos bifuncionales.

Además, con objeto de estudiar la estabilidad de la señal a largo plazo de estas mismas muestras de QDs, su luminiscencia fue registrada periódicamente desde el momento de su síntesis hasta después de cuatro meses de ser almacenados en la

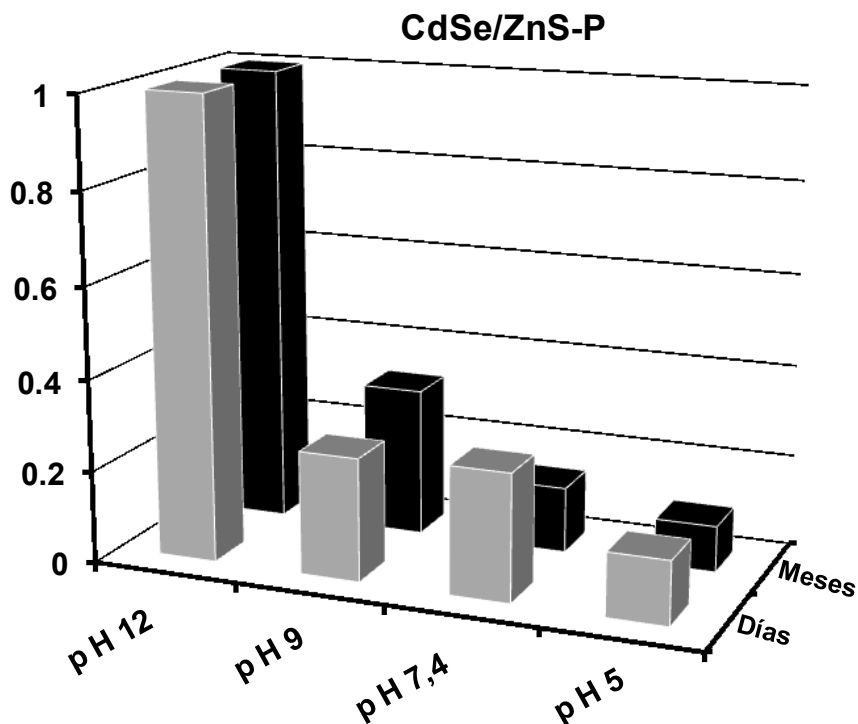
oscuridad. Así, en las suspensiones coloidales de QDs se observó que los QDs-P eran estables incluso después de varios meses tras su proceso de modificación, lo que indica que pueden ser utilizados después de haber sido almacenados durante periodos de tiempo largos. Por el contrario, los QDs modificados con MES y MAA mediante intercambio de ligandos sufren un proceso de agregación tan solo después de dos semanas tras su síntesis, siendo dicho proceso visible a simple vista ya que la mayoría de los QDs se encuentran precipitados en el fondo de los viales que contienen las muestras a diferentes pHs (Ver Figura 32).



**Figura 32.** Imágenes de diferentes disoluciones de QDs de CdSe/ZnS modificados por interacción con polímero (QDs-P), o intercambios de ligandos con ácido mercaptoacético (QDs-MAA) y ácido mercaptoetanosulfónico (QDs-MES). A) imagen de disoluciones de QDs recién sintetizados cuando se iluminan con luz ultravioleta; B) imagen de las disoluciones tras dos semanas desde el proceso de modificación obtenida bajo irradiación UV; C) imagen de las disoluciones de QDs tras dos semanas desde su modificación observada a la luz natural.

La intensidad de emisión fluorescente de los QDs fue registrada periódicamente. En la Figura 33 se observa la elevada estabilidad de los QDs cuya superficie se encuentra modificada con un polímero anfifílico. Además el comportamiento de la emisión fluorescente de los QDs-P en función del pH se mantiene incluso cuatro meses después del proceso de modificación, así la mayor intensidad de fluorescencia se consigue a pH 12, y las menores intensidades de emisión se obtienen en condiciones más ácidas independientemente del tiempo transcurrido

desde la modificación de los QDs. Sin embargo, los QD modificados mediante un procedimiento de intercambio de ligandos presentan un comportamiento frente al pH ligeramente distinto cuando ha transcurrido tiempo desde el proceso de solubilización en medio acuoso.



**Figura 33.** Evolución de la emisión de luminiscencia de QDs CdSe/ZnS-P en medio acuoso a diferentes pHs: medidas efectuadas días después del proceso de modificación y medidas de fluorescencia efectuadas cuatro meses después de la modificación superficial.

#### D.1.3.5 Tiempos de vida media de la emisión luminiscente.

Para llevar a cabo las medidas de tiempo de vida media de las disoluciones coloidales de QDs bajo estudio se realizaron medidas de tiempo resuelto empleando la técnica de TCSPC (Time Correlated Single Photon Counting) empleando un espectrofluorímetro Horiba Jobin Yvon FluoroLog 3. Para la excitación se utilizó un láser de diodo con una longitud de onda de excitación 375 nm, mientras que la detección se fijó en función de la longitud de onda del máximo de emisión para cada muestra coloidal.

Tras excitar los QDs con un láser pulsado (de periodo corto) se realizó, el ajuste multiexponencial de la emisión luminiscente (habitualmente se emplea para describir la curva asociada al proceso de decaimiento de los QDs, aunque se puede obtener un buen comportamiento cuando los datos se ajustan a una curva monoexponencial). Cuando se comparan las diferentes vías de solubilización de los QDs de CdSe/ZnS los



tiempos de vida media más elevados se obtuvieron para los QDs de CdSe/ZnS-MAA (33 ns), mientras que los QDs con recubrimiento polimérico CdSe/ZnS-P presentaron un tiempo de vida media más corto (25 ns). Además, los resultados muestran que la capa adicional de ZnS es crítica cuando los QDs están dispersos en disolución acuosa: los tiempos de vida son más largos en el caso de los QDs CdSe/ZnS. En el caso de CdSe-MAA el tiempo de vida es de 15 ns, y de 17 ns en el caso de CdSe-P, esta reducción puede ser atribuida a la gran influencia que tiene el entorno del núcleo de la nanopartícula en el caso de CdSe en comparación con los QDs tipo núcleo/recubrimiento CdSe/ZnS, menos afectados por el entorno. El recubrimiento adicional de ZnS previene parcialmente la fotooxidación de la superficie del núcleo obteniéndose así tiempos de vida más largos. Este efecto es menos acusado cuando los QDs están dispersos en cloroformo, donde la presencia de oxígeno en el medio es menor.

#### **D.1.3.6 Rendimiento cuántico (Q) de los quantum dots.**

Como hemos mencionado anteriormente las propiedades luminiscentes de los QDs están íntimamente relacionadas con el estado de la superficie de la nanopartícula. Normalmente se relacionan los valores bajos de rendimiento cuántico de la fluorescencia con la presencia de defectos o “trampas” en la superficie de la nanopartícula para el electrón o el hueco, desfavoreciéndose así la recombinación radiacional. Estos defectos generan estados de mínima energía dentro del salto de banda del semiconductor, reduciéndose las probabilidades de recombinación del par electrón/hueco. Los estados superficiales de mínima energía están presentes como consecuencia de enlaces incompletos o dañados entre algunos de los átomos que lo constituyen, y por lo tanto, es de esperar que cualquier modificación superficial de los QDs pueda provocar cambios en los rendimientos cuánticos  $Q$  de la luminiscencia.

En este estudio, los rendimientos cuánticos  $Q$  de la luminiscencia de las distintas nanopartículas se calcularon a través de un método relativo siguiendo el protocolo descrito en el apartado C.3.7, que implica el uso de estándares. En nuestro caso hemos seleccionado Rodamina 6G disuelta en etanol como sistema fluorescente de referencia que posee un  $Q = 95 \%$ . Se utilizaron QDs únicamente de tipo núcleo/recubrimiento CdSe/ZnS, solubles en medio orgánico y en medio acuoso a dos pH diferentes, ya que como hemos mencionado son lo que presentan las mayores intensidades de emisión, como se observa también en la Figura 28 a simple vista. Para

el seleccionó el pH=12 por ser el medio al que presentan mejores intensidades luminiscentes, y pH=7,4 con objeto de simular las condiciones fisiológicas por el potencial uso de los QDs como marcadores biológicos.

**Tabla 2.** Rendimientos cuánticos  $Q$  estimados de QDs de CdSe/ZnS con diferente modificación superficial y en distintos medios.

Muestras QDs	Rendimiento Cuántico $Q$ (%)
CdSe/ZnS en CHCl <sub>3</sub>	11
CdSe/ZnS-P pH 12	19
CdSe/ZnS-P pH 7,4	3
CdSe/ZnS-MAA pH 12	6
CdSe/ZnS-MAA pH 7,4	4
CdSe/ZnS-MES pH 12	8
CdSe/ZnS-MES pH 7,4	5

Todas las muestras de QDs utilizadas presentaban unos valores de absorbancia inferiores a 0,1 unidades a la longitud de onda de excitación 480 nm (*Ver sección C.3.7 Evaluación del rendimiento cuántico*). Aplicando las ecuaciones del rendimiento cuántico  $Q$  Ecuación 13 o Ecuación 14) se obtienen los valores de  $Q$  recogidos en la Tabla 2.

Los QDs de CdSe/ZnS en cloroformo, que están rodeados únicamente por ligandos hidrófobos TOP/TOPO y no han sufrido ningún tipo de modificación posterior al proceso de síntesis, presentan un rendimiento cuántico en torno al 10%. Sin embargo, la luminiscencia de los CdSe/ZnS-P a pH=12 presentan un valor de  $Q$  más elevado que el mismo tipo de nanopartículas en cloroformo. Sin tener en cuenta ningún tipo de efecto de fotoactivación, el valor de rendimiento para los CdSe/ZnS a pH 12 esta alrededor del 20%. Sin embargo, desafortunadamente dicho valor decrece significativamente cuando el mismo tipo de nanopartículas se somete a un proceso de cambio de disolución reguladora para obtener QDs a pH=7,4.

Por otra parte las nanopartículas modificadas por intercambio de ligandos, CdSe/ZnS-MES y CdSe/ZnS-MAA, presentan unos valores de rendimiento próximos

al 10% cuando las nanopartículas están dispersos en medio básico, pero significativamente más bajos cuando se reduce el pH a 7,4. Estos bajos valores de rendimientos cuánticos pueden atribuirse al hecho de que el proceso de modificación mediante intercambio de ligandos es un proceso mucho más agresivo, donde el número de enlaces incompletos o defectos superficiales pueden aumentar significativamente después del procedimiento de intercambio de ligandos. Como la capa de ligandos hidrófobos nativos (TOP, TOPO, HPA) es preservada, y no eliminada, durante el proceso de recubrimiento con polímero, este hecho puede explicar que los valores superiores de rendimiento cuántico de la luminiscencia que se obtienen para los CdSe/ZnS-P comparados con los CdSe/ZnS-MAA o CdSe/ZnS-MES. En resumen los valores de rendimiento cuántico que se obtienen en disoluciones básicas son más elevados, debido al valor de pKa de los grupo tiol anclados (MAA, MES) a la superficie de la nanopartícula. Cuando disminuye el valor del pH, los grupos tiol se protonan, y el equilibrio dinámico se desplaza hacia la desorción de los ligandos superficiales, aumentándose así el número de nanocristales con menor superficie pasivada, y por tanto conduciendo así al empeoramiento de las propiedades luminiscentes respecto a las mismas propiedades en medio básico, entre ellas el rendimiento cuántico.

A lo largo de este primer capítulo se ha evaluado comparativamente a través de distintos estudios el comportamiento coloidal de QDs de CdSe y CdSe/ZnS con diferente recubrimiento superficial. Hemos observado que la luminiscencia de los QDs está afectada de forma significativa por el pH del medio, y el grado de esta influencia depende del tipo de recubrimiento que tenga la nanopartícula para proporcionar la solubilidad en disolución acuosa. Se ha comprobado que a pesar de que la luminiscencia de los QDs modificados por intercambio de ligandos está menos afectada por el pH, su estabilidad coloidal es mucho menor, ya que parte de las nanopartículas se agregan y precipitan pocos días después de su modificación, debido a la desorción parcial de los ligandos superficiales. Por el contrario, las nanopartículas modificadas mediante la interacción con polímero anfífilico presentan una mayor estabilidad coloidal, y escasos problemas de agregación incluso a pH ácido y varios meses después del proceso de solubilización. La química de los ligandos superficiales está directamente relacionada con los rendimientos cuánticos de la fluorescencia y los valores de tiempo de vida.

#### **D.1.3.7 Estudio de la estabilidad de QDs de CdSe/ZnS mediante análisis por AF4.**

De entre todas las muestras estudiadas, sin duda la que mejores propiedades ha demostrado en términos de estabilidad coloidal, estabilidad a largo plazo y propiedades luminiscentes, son los QDs de CdSe/ZnS-P. Por ello, con objeto de conocer más detalladamente el comportamiento de este tipo de nanopartículas coloidales se llevaron a cabo análisis complementarios buscando obtener información adicional sobre la naturaleza y estabilidad de estos QDs.

En el desarrollo de una metodología analítica en la que se utilicen, bien QDs o cualquier tipo de nanopartícula como marcador luminiscente, es necesario conocer no únicamente las propiedades ópticas o la concentración de las nanopartículas, sino que también es importante conocer otras características físico-químicas (p. ej. tamaño, forma, grado de agregación, estabilidad coloidal, etc), ya que se pueden limitar algunas aplicaciones analíticas. Sin embargo, lograr una caracterización más completa de las nanopartículas sintetizadas o modificadas posteriormente puede requerir de la combinación de varias técnicas analíticas.

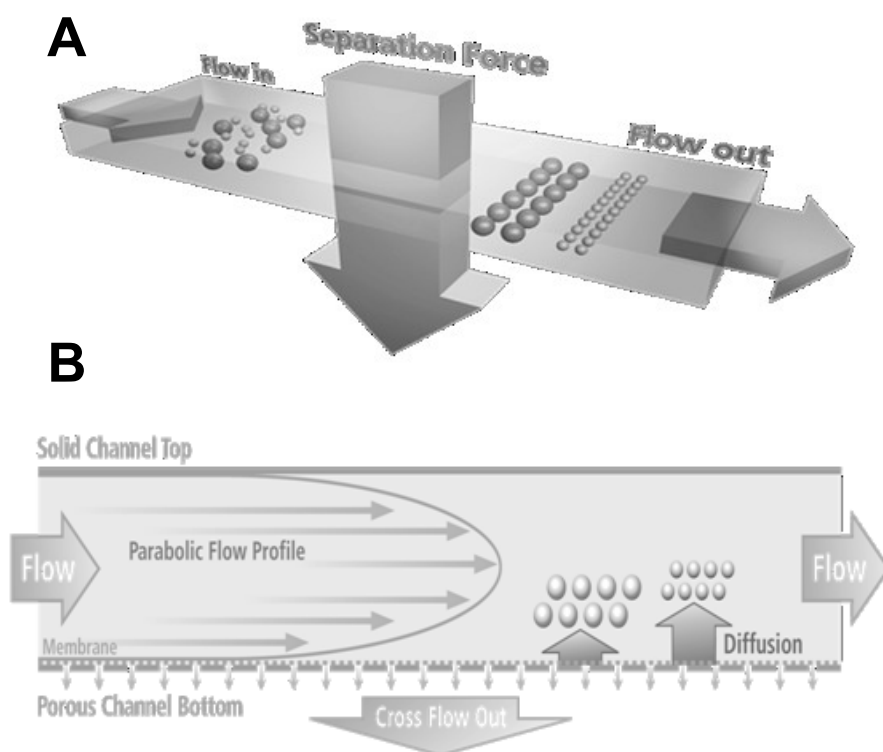
En nuestro caso, para profundizar en la caracterización de los QDs de CdSe/ZnS-P sintetizados en nuestro laboratorio utilizaremos un sistema híbridos combinando una técnica de separación potente Asymmetric Flow Field Flow Fractionation (AF4) capaz de permitir la separación de nanopartículas de distinto tamaño. Esta técnica de separación acoplada a distintos detectores como MALS (Multiangle Light Scattering), Vis-Uv o IR permite obtener información complementaria. El objetivo que se persigue empleando dicha técnica es estudiar el potencial analítico de la misma como sistema de separación que permita proporcionar información del tamaño de las nanopartículas, estados de agregación estabilidad o el tamaño de los recubrimientos empleados para solubilizar las nanopartículas en medios biocompatibles y minimizar su toxicidad.

##### **D.1.3.7.1 Descripción de la técnica de separación AF4:**

La técnica de FFF (Field-Flow Fractionation)<sup>7</sup> es una técnica de separación hidrodinámica de flujo asistido que permite la separación física de pequeñas cantidades (masas en el intervalo de ng- $\mu$ g) de macromoléculas o partículas. Esta técnica de separación ha captado la atención de los investigadores como técnica complementaria para una adecuada caracterización de las nanopartículas. En función del campo aplicado para la separación tendremos diferentes modalidades de FFF. Si se

aplica un flujo secundario perpendicular hablaremos de Flow-FFF (F4), y la separación tendrá lugar en función del coeficiente de difusión. Si se aplican otro tipo de fuerzas o campos en la separación tendremos: electrical-FFF si se aplican campos eléctricos, magnetic-FFF en el caso de campos magnéticos, o SedFFF si la fuerza aplicada es una fuerza centrífuga, no obstante entre todas estas variantes la más utilizada es la técnica de F4.

De forma general podemos decir que la separación de las partículas se alcanza a lo largo del canal debido a la retención de las mismas. Este proceso de retención tiene lugar como consecuencia del proceso de difusión de las partículas en el canal y como consecuencia de la propia acción de un flujo externo aplicado de forma perpendicular al flujo conductor a través del canal de FFF (Ver Figura 34A). El flujo externo dirige a las partículas hacia la pared de acumulación (Ver Figura 34B), desde donde difunden de nuevo hacia el canal. Estas partículas forman "nubes" en el canal cuyo espesor depende del coeficiente de difusión de las partículas y de la fuerza de interacción aplicada de forma perpendicular al flujo conductor. Para el caso de F4, si el flujo externo aplicado es constante y las partículas son esferas compactas homogéneas, el tamaño de las nubes formadas se puede relacionar con el coeficiente de difusión y con el radio hidrodinámico.



**Figura 34.** A) Esquema representativo del mecanismo general de separación en FFF. B) Representación esquemática del mecanismo de separación en el caso de AF4.

Para F4 hay dos posibles modos de elución o separación en función del tamaño de las partículas y del espesor de la nube de partículas formada: modo *normal* o *browniano* y modo *estérico*. El primer caso (*modo normal* o *browniano*) tiene lugar con partículas lo suficientemente pequeñas, cuyo tamaño es despreciable en comparación con el tamaño de la “nube” formada. A mayor coeficiente de difusión, mayor espesor de la nube formada por las partículas en contraposición a las fuerzas que están actuando sobre ellas. Como consecuencia del perfil parabólico del flujo conductor, a mayor tamaño de nube mayor es la velocidad de las partículas que la forman, por lo que las partículas pequeñas eluiran antes que las de mayor tamaño.

El *modo* de separación *estérico* tiene lugar cuando las partículas no son mucho más pequeñas comparadas con el tamaño de la nube difusional que forman. Esto tiene lugar cuando el espesor de la nube difusional es despreciable (comparado con el tamaño de la nanopartícula) o es suprimido por un fuerte campo externo. En modo estérico, las nanopartículas de mayor tamaño eluyen antes que las pequeñas, ya que la velocidad a lo largo del canal esta ahora determinada por la extensión de las partículas en el canal más que por la extensión de las nubes difusionales.

Como norma general podemos decir que las partículas de tamaño entre 1-1000 nm se separan en modo normal, y las partículas de 1-100  $\mu\text{m}$  se separan en modo estérico. Por lo tanto es necesario calcular el punto de inversión estérica, es decir, el punto a partir del cual el modo normal se comienza a convertir en el modo estérico debido al aumento del tamaño de la partícula y al decrecimiento del espesor de la nube.

Existen dos tipos de F4, simétrico (sF4) y asimétrico (aF4) se diferencian en la forma en la que se genera el flujo perpendicular. Nosotros nos centraremos en el sistema aF4, en el cual la pared superior del canal es impermeable y el flujo cruzado es generado por una velocidad de flujo elevada a la entrada del canal. La inyección de la muestra es seguida de una etapa de “enfoque”, donde se genera un flujo opuesto equilibrado de forma simultánea desde la entrada y la salida del canal. La detección de las partículas tras el proceso de separación en el canal de FFF se puede llevar a cabo con detectores *on line*: Ultravioleta-visible (UV-Vis) o ICP-OES (Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Spectrometry) o ICP-MS (Inductively Coupled Plasma -

mass spectrometry). También cabe la posibilidad de utilizar otros detectores *off line*: SEM (Scanning Electron Microscopy) o TEM (Transmission Electron Microscopy).

En nuestro caso hemos empleado la técnica de AF4 acoplada a varios detectores MALS-FD como MALS (Multiangle Light Scattering), Vis-Uv o IR para obtener información complementaria. Como hemos visto, cuando se trabaja con nanomateriales es necesario someterlos a diversos procesos de modificación, por lo que un correcto análisis y caracterización de los nanomateriales después de cada etapa sería deseable para asegurar una buena calidad del nanomaterial. La técnica de AF4 no sólo permite el fraccionamiento en función del tamaño de las nanopartículas, sino también conocer el valor del hidrodinámico ( $rh$ ), además de la posibilidad de separar el nanomaterial de interés de la muestra del resto de componentes no enlazados todavía presentes en disolución. El uso del detector de fluorescencia nos permite estudiar las propiedades ópticas de las nanopartículas puras, y para obtener información adicional podemos hacer uso del detector Vis-UV o de un detector de índice de refracción RI. Por último el detector de MALS en línea con el sistema de separación nos permitiría conocer el valor del radio de giro o de rotación ( $rg$ ) de las nanopartículas fraccionadas. Además de la información sobre la estabilidad de la nanopartícula, combinando los valores de tamaño obtenidos en el cociente  $rh / rg$ , se puede obtener información acerca de la morfología de la nanopartícula.

La cromatografía de exclusión por tamaños (SEC Size Exclusion Chromatography), también se ha aplicado a la separación de muestras complejas de nanopartículas, entre ellas QDs<sup>8</sup>. Sin embargo, la selectividad de esta técnica de separación de tamaños es limitada para analitos de elevado peso molecular, como es el caso de las nanopartículas, y por otra parte las interacciones de la nanopartícula con la fase estacionaria pueden alterar la morfología, la retención, y la recuperación, lo que provocaría la consiguiente alteración de los resultados de la distribución de tamaños.

El AF4 es una técnica de flujo asistida especialmente adecuada para separar analitos dispersos en función de su tamaño en un amplio intervalo. A diferencia de la técnica de SEC, el intervalo típico de tamaños de las nanopartículas a separar está dentro del intervalo de aplicación de la técnica de AF4: de hecho, se han utilizado nanopartículas de poliestireno como analitos estándares para desarrollar métodos e instrumentación de AF4. Desde hace años se ha empleado la separación de NPs con AF4 y su detección en línea con MALS para separar y caracterizar estos nanomateriales<sup>9,10,11</sup>. Mediante el empleo de AF4-MALS, el valor del radio de giro  $rg$  y

la  $M_r$  masa molecular, pueden obtenerse incluso en muestras de nanopartículas con una amplia distribución de tamaños. Los valores de  $rh$  calculados a partir de los tiempos de retención del AF4, pueden ser comparados con los valores de  $rg$  determinados por la medida de MALS para obtener información de la morfología y el patrón de la nanopartícula, ya que la relación  $rh/rg$  depende de la forma de la nanopartícula. AF4-MALS es una técnica de separación que ha demostrado ser efectiva para el análisis y caracterización de nanopartículas complejas. En campos como las ciencias medioambientales<sup>12</sup> o farmacéuticas, se han descrito métodos para la caracterización de nanopartículas magnéticas empleadas en nanomedicina<sup>13</sup>.

#### D.1.3.7.2 Medida del tamaño de las nanopartículas: detectores habituales.

La definición de tamaño (p. ej. geométrico, hidrodinámico u óptico) de nanopartícula depende en gran medida del método que se utilice para llevar a cabo la caracterización del mismo. No hay un único método para caracterizar completamente el tamaño de muestras de materiales nanoestructuradas, y la comparación entre los distintos resultados puede ser muy compleja. Por ejemplo, las medidas de microscopía electrónica (SEM o TEM) permiten la determinación directa del tamaño geométrico y la forma de la nanopartícula. Sin embargo, el trabajo de microscopía es laborioso, debido al proceso de preparación de muestras y al elevado número de nanopartículas que tienen que ser analizadas para conseguir tener una distribución de tamaños estadísticamente significativa. Además, hay que tener en cuenta el hecho de que las nanopartículas se observan en condiciones de vacío y sequedad bajo una fuente de elevada energía, por lo que la morfología o el tamaño que se observa puede variar de forma significativa respecto a la morfología o el tamaño de la estructura nativa cuando las nanopartículas están dispersas en medio acuoso.

Otra alternativa ampliamente utilizada para la medida del tamaño de nanopartículas son los métodos de dispersión de la luz como el LS (Light Scattering) o DLS (Dynamic Light Scattering), ampliamente utilizados para analizar el tamaño de nanopartículas, y la distribución de tamaños de la mezcla. DLS mide el coeficiente de difusión de Stokes ( $D$ ) de las nanopartículas en el medio de dispersión, que se relaciona directamente con el radio hidrodinámico ( $rh$ ). El análisis mediante DLS es rápido, y requiere una escasa manipulación de muestra, ya que la misma puede ser medida en diferentes medios de dispersión. Sin embargo, DLS no nos proporciona información de la morfología de la nanopartícula y la densidad de distribución. También en el caso de



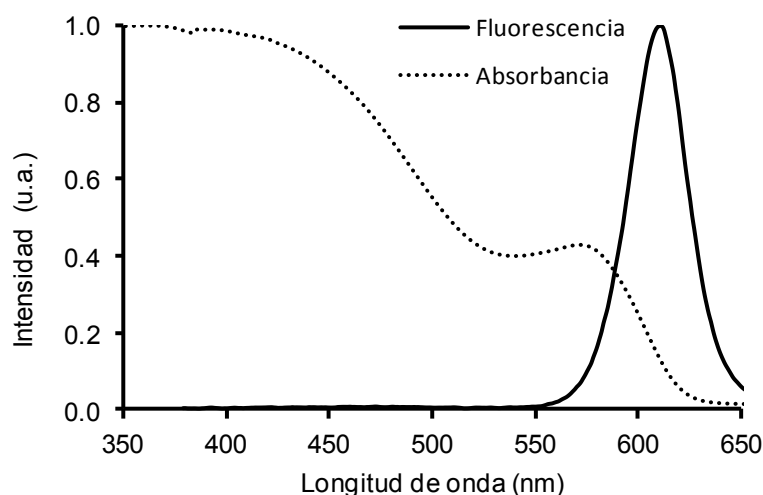
que el nanomaterial sea complejo la precisión de la medida puede ser limitada. Otra alternativa la constituye el MALS (Multi-Angle Light Scattering) que permite la determinación de la masa molecular de la nanopartícula sin necesidad de una calibración, siempre que se conozca o se mida el incremento de la concentración y el índice de refracción específico  $dn/dc$ .

La detección por MALS proporciona información acerca de la conformación y la estructura interna. Este tipo de detección es aplicable en un intervalo de tamaños desde 1 nm a 1  $\mu\text{m}$ , pero su sensibilidad decrece a medida que decrece el tamaño de la nanopartícula. Como en el caso del DLS, la precisión de la detección por MALS es reducida en el caso de muestras complejas. Se puede mejorar la precisión de la medida si se combina la detección por medio de MALS o DLS con técnicas de separación en función del tamaño. Haciendo uso de técnicas de separación en función del tamaño, se pueden recoger fracciones monodispersas de nanopartículas con fines preparativos, para su posterior caracterización.

El objetivo que se persigue a través del uso del equipo de AF4-MALS-FD es llevar a cabo el análisis y caracterización más profunda de los QDs de CdSe/ZnS-P como nanomateriales fluorescentes. Esta técnica permite el estudio de la distribución de tamaños de las nanopartículas, así como monitorizar la posible agregación de las mismas. Además el proceso de fraccionamiento permite separar las nanopartículas de interés de los componentes de bajo peso molecular, no enlazados que todavía están presentes en disolución. Durante el proceso de separación se estudian también las propiedades ópticas mediante detector de fluorescencia y de índice de refracción.

### D.1.3.7.3 Resultados del análisis de la muestra de QDs CdSe/ZnS-P.

Las características espectroscópicas (absorbancia y fluorescencia) de los QDs de CdSe/ZnS-P bajo estudio se recogen en la Figura 35. El espectro de absorbancia presenta una absorbancia característica a 570 nm, y el máximo del espectro de emisión está alrededor de 600 nm.



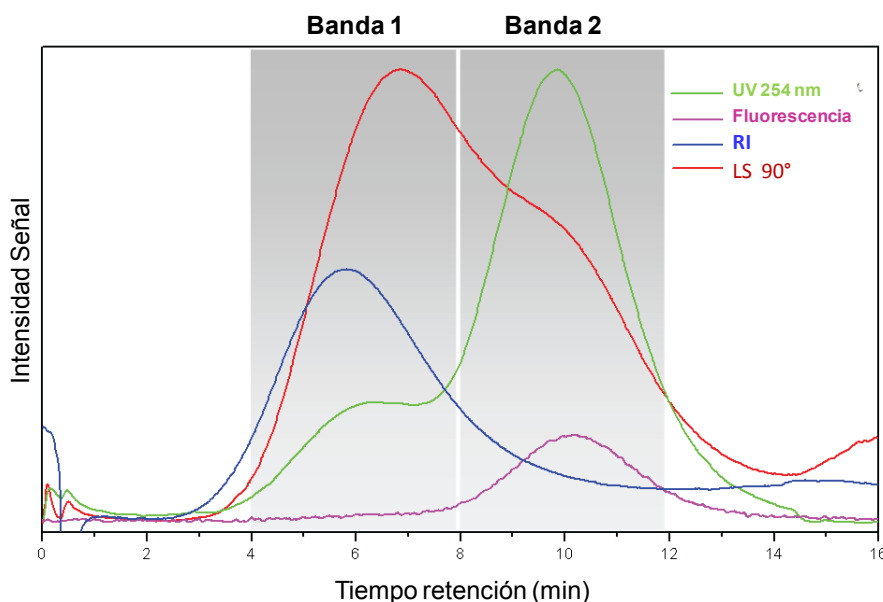
**Figura 35.** Espectro de absorción y fluorescencia de la muestra de CdSe/ZnS-P coloidales estudiados en medio acuoso a pH=12.

Las condiciones experimentales del método utilizado se detallan a continuación. La velocidad de flujo del canal se fijó en 1,0 mL/min y la velocidad del flujo de inyección en 0,2 mL/min. Las muestras se inyectaron y enfocaron a un flujo de 1,5 mL/min. En la etapa de elución se estableció un flujo perpendicular de 2,0 mL/min, decreciendo progresivamente hasta 0 mL/min en 15 minutos. Tras esta etapa el flujo perpendicular se mantuvo en 0 mL/min durante 1 minuto. Finalmente se hace una inyección a un flujo de 0,2 mL/min de nuevo para limpiar el canal de inyección de los posibles residuos. El tiempo total de análisis fue de 24 minutos. El espesor del canal fue de 350  $\mu\text{m}$  y 240 mm de longitud. Se utilizó una membrana de celulosa de 10 kDa, y se inyectaron alícuotas de muestra de 10  $\mu\text{L}$ . Como disolución portadora se empleó PBS (Phosphate Buffer Saline) de pH 7,4 (8 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 1,5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl).

Hay que tener en cuenta una serie de parámetros que poseen gran influencia sobre la calidad de la separación: la composición de la disolución portadora (pH, fuerza iónica y composición química influyen sobre las propiedades electrostáticas de la membrana y las nanopartículas), el tipo de membrana utilizada en la separación, las dimensiones del canal de separación y el flujo perpendicular aplicado. Asimismo, si los tiempos de enfoque aplicados son demasiado cortos, la muestra no se habrá equilibrado el tiempo suficiente en el canal y obtendremos un pico de mayor tamaño en el tiempo muerto. Si utilizamos un flujo perpendicular demasiado bajo puede que no logremos separar las partículas, y si este flujo es muy elevado corremos el riesgo de

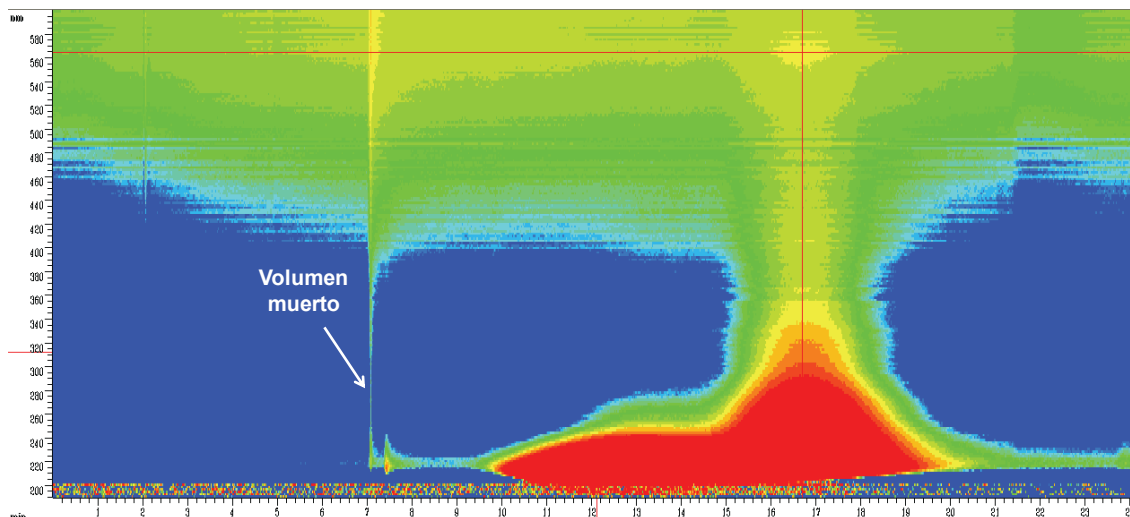
que aumente la interacción con la membrana, y que la muestra se diluya demasiado. Por otro lado hay que tener en cuenta la importancia del espesor del canal, normalmente a mayor espesor se incrementa la resolución. También hay que tener en cuenta la cantidad de muestra que se inyecta, no debe ser muy elevada, puesto que se corre el riesgo de perder resolución en la separación y modificar la forma de pico.

En la Figura 36 se recoge el perfil fractográfico obtenido a partir del análisis por AF4 acoplado con un detector UV/Vis (verde), MALS (rojo), fluorescencia (rosa), índice de refracción RI (azul). De acuerdo con el espectro de fluorescencia de la Figura 35, la señal de fluorescencia se registró estableciendo como longitud de onda de excitación 370 nm y 600 nm como longitud de onda de emisión. La señal de absorbancia se recogió a 254 nm (verde), y la señal de LS a 90° (rojo) muestra la presencia de dos poblaciones de nanopartículas, una de ellas en torno a tiempos de retención de 6 min (banda 1) y otra a los 10 min (banda 2). Por otro lado, la señal de fluorescencia (rosa) se observa únicamente a tiempos de retención largos (banda 2), lo que sugiere que los QDs-P eluyen entre los tiempos de retención de 8 y 12 min solamente. La ausencia de la señal de fluorescencia a tiempos cortos indica que la población que compone la primera banda no está constituida por QDs.



**Figura 36.** Perfiles de elución obtenidos para la muestra CdSe/ZnS-P mediante UV/Vis a 254 nm (verde), MALS (rojo), RI (azul) y fluorescencia (rosa). La señal de fluorescencia se registró estableciendo como longitud de onda 370 nm y 600 nm como longitud de onda de emisión.

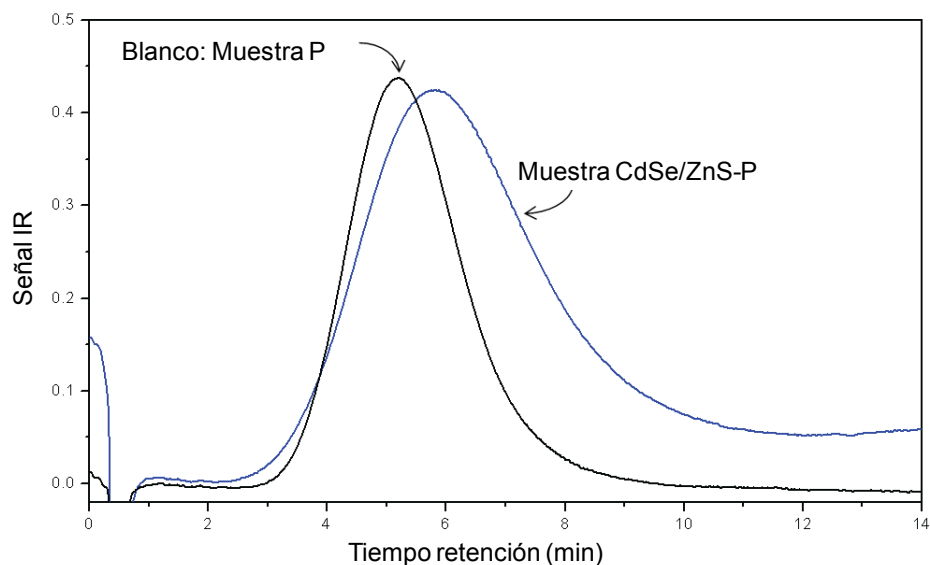
El espectro de absorbancia registrado durante todo el análisis sostiene dicha hipótesis. En la Figura 37 se muestra un gráfico tridimensional donde se representa la señal de absorbancia en función del tiempo (eje x) y la longitud de onda (nm). La absorción característica a 570 nm se observa únicamente a 17 min, tiempo al cual la mayor señal de fluorescencia es registrada (en esta gráfica el volumen muerto no está restado y este aparece a los 7 min).



**Figura 37.** Representación gráfica 3D de la variación de la absorbancia con el tiempo (eje x) y longitud de onda (eje y). Volumen muerto  $t = 7$  min.

A partir del tiempo de retención de los QDs se obtiene un valor de  $rh \sim 14$  nm aplicando la teoría de retención de F4. Puesto que el núcleo de CdSe de los QDs se había estimado previamente en torno a 3,6 nm (mediante el protocolo C.3.6), el valor de  $rh$  obtenido indica la presencia de un recubrimiento polimérico en torno a 12 nm de espesor. No se pueden llegar a obtener valores más exactos de  $rg$  a partir de las señales de MALS, ya que como sugieren los valores de  $rh$  calculados a partir del tiempo de retención, podrían estar en torno a los 10 nm, el cual sería el límite más bajo para la medida exacta de tamaños empleando un detector MALS. En el caso de la población que eluye a tiempos de retención cortos (banda 1), los valores de  $rh$  se estiman entre los 4,5 y 10 nm. La ausencia de la señal de fluorescencia al tiempo de retención corto indica que esas partículas tan pequeñas no pueden estar constituidas por los núcleos de CdSe/ZnS, podrían estar constituidas exclusivamente por una parte del polímero o el tensoactivo que se autoensambla sin incluir en su interior los núcleos de CdSe/ZnS de QDs.

Para determinar si el tensoactivo o el polímero anfifílico se puede autoensamblar en nanoestructuras de forma aislada, se analizó una muestra sintetizada como blanco. Esta muestra se preparó, siguiendo el mismo protocolo que para la preparación de la muestra de CdSe/ZnS-P, pero en ausencia de QDs. El blanco de la muestra fue analizado en las mismas condiciones experimentales empleadas para la muestras de CdSe/ZnS-P. Las señales de RI obtenidas del análisis con AF4 de la muestra de QDs y del blanco están superpuestas en la Figura 38.



**Figura 38.** Perfiles de la muestra de CdSe/ZnS-P (azul) y el blanco P (negro) en las mismas condiciones experimentales. Se comparan las señales de RI.

El hecho de que el blanco de las muestras presente una población al mismo tiempo de retención bajo que la muestra de CdSe/ZnS-P sugiere que el polímero se autoensambla en nanoestructuras que no incluyen en su interior el núcleo del QD. Estos datos proporcionan información fundamental sobre la síntesis y modificación de los QDs, y para sus potenciales aplicaciones. Dicha información no se podría obtener si se utilizaran los mismos detectores de forma independiente. De hecho sin hacer uso del AF4 como técnica de separación, los métodos de dispersión LS apenas pueden discriminar entre NPs tipo core/shell o núcleo/recubrimiento de tamaño muy similar. Este es el caso de los QDs-P y las nanoestructuras de polímero P que no incluyen los QDs en su interior. Por otro lado, los métodos espectroscópicos capaces de distinguir nanopartículas diferentes, no son capaces de discriminar partículas de diferente tamaño sin utilizar un método de separación por tamaños. AF4 con un sistema de separación con detección múltiple es capaz de caracterizar el tamaño de los QDs, y determinar de forma simultánea la posible presencia en la muestra de otros

componentes, originados con probabilidad a partir del autoensamblaje de los componentes que se utilizan para solubilizar el QD en medio acuoso.

#### D.1.4 Referencia

- <sup>1</sup> U. Resch-Genger, M. Grabolle, S. Cavaliere-Jaricot, R. Nitscheke, T. Nann, **Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels**. *Nature Methods*, 2008, 5, 9, 763-775.
- <sup>2</sup> R. E. Bailey, A. M. Smith, S. Nie, **Quantum dots in biology and medicine**. *Physica E*, 2004, 25, 1-12.
- <sup>3</sup> B. O. Dabbousi, J. Rodriguez-Viejo, F. V. Mikulec, J. R. Heine, H. Mattoussi, R. Ober, K. F. Jensen, M. G. Bawendi, **(CdSe)ZnS Core-shell quantum dots: Synthesis and characterization of a size series of highly luminescent nanocrystallites**. *The Journal of Physical Chemistry B*, 1997, 101, 9463-9475.
- <sup>4</sup> X. Peng, M. C. Schlamp, A. V. Kadavanich, A. P. Alivisatos, **Epitaxial growth of highly luminescent CdSe/CdS core/shell nanocrystals with photostability and electronic accessibility**. *Journal of the American Chemical Society*, 1997, 119, 7019-7029.
- <sup>5</sup> W. W. Yu, L. Qu, W. Guo, X. Peng, **Experimental determination of the extinction coefficient of CdTe, CdSe and CdS nanocrystals**. *Chemistry of Materials*, 2003, 15, 2854-2860.
- <sup>6</sup> J. Aldana, N. Lavelle, Y. Wang, X. Peng, **Size-dependent dissociation pH of thiolate ligands from cadmium chalcogenide nanocrystals**. *Journal of the American Chemical Society*, 2005, 127, 2496- *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 2496-2504.
- <sup>7</sup> F. Kammer, S. Legros, E. H. Larsen, K. Loeschner, T. Hofmann, **Separation and characterization of nanoparticles in complex food and environmental samples by field-flow fractionation**. *Trends in Analytical Chemistry*, 2011, 30, 425-436.
- <sup>8</sup> K. M. Krueger, A. M. Al-Somali, J. C. Falkner, V. L. Colvin, **Characterization of nanocrystalline CdSe by Size Exclusion Chromatography**. *Analytical Chemistry*, 2005, 77, 3511-3515.
- <sup>9</sup> D. Roessner, W-M. Kulicke, **On-line coupling of flow field flow fractionation and multi-angle laser light scattering**. *Journal of Chromatographic A*, 1994, 687, 249-258.
- <sup>10</sup> H. Thielking, D. Roessner, W-M. Kulicke, **On-line coupling of Flow Field Flow Fractionation and Multiangle Laser Light Scattering for the characterization of polystyrene particles**. *Analytical Chemistry*, 1995, 67, 3229-3233.
- <sup>11</sup> P. J. Wyatt, **Submicrometer particle sizing by Multiangle Light Scattering following fractionation**. *Journal of Colloid and Interface Science*, 1998, 197, 9-28.

<sup>12</sup> S. Dubascoux, F. Von Der Kammer, I. Le Hecho, M. P. Gautier, G. Lespes, **Optimisation of Asymmetrical Flow Field Flow Fractionation for environmental nanoparticles separation.** Journal of Chromatography A, 2008, 1206, 160-165.

<sup>13</sup> J. Lohrke, A. Briel, K. Mäder, **Characterization of superparamagnetic iron oxide nanoparticles by Asymmetrical Flow-Field-Flow-Fractionation.** Nanomedicine, 2008, 3, 437-452.

## D.2 FOTOACTIVACIÓN DE LAS DISOLUCIONES COLOIDALES DE QUANTUM DOTS: INFLUENCIA DE LA COMPOSICIÓN Y DEL RECUBRIMIENTO.

### D.2.1 Antecedentes y objetivos.

El incremento de la luminiscencia de los QDs inducido por la acción de la luz (bien luz natural o bajo irradiación con luz ultravioleta) es un fenómeno bien conocido y documentado en la bibliografía. A este proceso de incremento “espontáneo” de la luminiscencia se le conoce generalmente como **fotoactivación** (*photoactivation, photoenhancement or photobrightening*). Sin embargo, a pesar de ser un fenómeno tan conocido y mencionado por numerosos autores en sus publicaciones científicas, son muy escasos los trabajos dedicados al estudio de dicho fenómeno en profundidad o que propongan algún mecanismo para explicar dicho proceso. Uno de los factores limitantes para el empleo de los QDs en aplicaciones bioanalíticas es la falta de conocimiento acerca de la química superficial y los procesos relacionados con la superficie de la nanopartícula, tales como la estabilidad y la citotoxicidad<sup>1,2,3,4</sup>. En este contexto la fotoactivación tiene una gran influencia por un lado sobre las propiedades ópticas de la nanopartículas, y por otro sobre las posibles aplicaciones de estos nanomateriales. El proceso está altamente influenciado por el tipo de QDs y por el entorno que rodea a la nanopartícula<sup>1</sup>. Por todo ello, un estudio en profundidad acerca del proceso de fotoactivación puede ser esencial para conocer el papel de los estados superficiales, y las reacciones sobre la superficie de la nanopartícula y sobre la mejora de la luminiscencia<sup>1</sup>. Sin embargo, dada la complejidad del proceso, el mecanismo exacto responsable del incremento en la intensidad de emisión luminiscente es desconocido, ya que la mayoría de trabajos se han limitado a estudiar los efectos del incremento de la luminiscencia, pero no sus causas.

La búsqueda de respuestas a este fenómeno no es una tarea sencilla, ya que el tipo de mecanismo involucrado en dicho proceso depende de la propia naturaleza de los QDs, de la estrategia de solubilización empleada, del medio que rodee a la nanopartícula, etc.

A lo largo de este capítulo se ha pretendido llevar a cabo un estudio comparativo detallado del comportamiento de QDs (con núcleos de CdSe y núcleos de CdSe con recubrimiento adicional de ZnS) con diferente modificación superficial para



hacerlos solubles en medio acuoso, en diferentes condiciones experimentales y dispersos en diferentes medios cuando son expuestos a una radiación UV durante largos periodos de tiempo.

Se pretendió llevar a cabo los estudios de fotoactivación desde una perspectiva diferente, basándonos en el análisis dinámico del comportamiento del proceso de fotoactivación. Se persigue conocer en profundidad el comportamiento de este tipo de nanopartículas bajo irradiación continua para poder emplearlas en posteriores aplicaciones como marcadores en aplicaciones biomédicas. Los resultados obtenidos muestran comportamientos distintos de las muestras de QDs después del proceso de irradiación en términos de: características luminiscentes, toxicidad potencial debido a la liberación de metales al medio, estabilidad de nanopartículas o degradación del recubrimiento superficial que proporciona la solubilidad en medio acuoso.

Por otro lado, la relativa rapidez a que tiene lugar la síntesis de los quantum dots (tiene lugar a elevada temperatura normalmente entre 150 °C-300°C) es una de las principales razones que justifica el escaso control que se tiene sobre la síntesis de estas nanopartículas y la baja reproducibilidad de la intensidad de fluorescencia observada. El hecho de que las nanopartículas de mejor calidad se obtienen cuando estas se estabilizan con moléculas coordinantes del tipo TOP/TOPO (insolubles en medio acuoso), hace de su proceso de síntesis en medio orgánico la vía de síntesis más conveniente para obtener QDs de elevada calidad. Sin embargo, esta metodología requiere una etapa adicional de modificación superficial necesaria para hacerlas solubles en medio acuoso. En nuestro caso las muestras se modificaron mediante la vía de intercambio de ligandos o bien mediante interacción con polímero anfifílico. No obstante, frecuentemente se han observado decrecimientos de la luminiscencia de los QDs cuando estos se emplean en sistemas biológicos, por ejemplo, derivados de la degradación parcial de la nanopartícula debido a reacciones de la superficie del semiconductor con el oxígeno del medio.

La exposición de las nanopartículas coloidales a luz UV o luz visible de forma continua ofrece la posibilidad de incrementar la luminiscencia de las nanopartículas tras el proceso de síntesis, el proceso de modificación superficial o el proceso de funcionalización<sup>5,6</sup>. A pesar de que se han desarrollado estudios sobre el incremento de la luminiscencia inducido por la irradiación, el mecanismo general que da lugar a este proceso no se comprende en su totalidad<sup>1</sup>. Esta falta de consenso acerca del mecanismo responsable radica en el hecho de que parámetros como: la presencia de oxígeno u

otras moléculas gaseosas, de agua, agentes estabilizantes empleados durante el proceso de síntesis o el tipo de ruta de estabilización seguida pueden influir notablemente en las propias nanopartículas y por tanto en el proceso de fotoactivación. Particularmente, se debería tener en cuenta que la estrategia utilizada para la síntesis y la solubilización de las nanopartículas semiconductoras influye sobre la superficie de la nanopartícula, y por lo tanto se espera que esto afecte de forma decisiva al proceso de fotoactivación, y por tanto influya en el tipo de mecanismo responsable.

El fenómeno de la fotoactivación fue detectado por primera vez en nanopartículas de CdSe-TOP/TOPO por Cordero<sup>3</sup> y col. . Con el tiempo resultados similares fueron obtenidos para QDs<sup>5,6,7,8</sup> de CdSe, CdSe/CdS, CdSe/ZnS en disolventes orgánicos, pero también se observa en otro tipo de QDs como por ejemplo ZnS/Mn<sup>9</sup> o PbS<sup>10</sup>. Este proceso no solamente se ha observado en el caso de que las nanopartículas estén presentes en medio orgánico, sino también en medio acuoso, como p. ej. CdSe-citrato<sup>11</sup>, QDs estabilizados a través de grupos tiol como el CdSe<sup>12</sup>, ZnSe<sup>13</sup> o CdTe<sup>14</sup>. Se pueden encontrar en la bibliografía diferentes interpretaciones que intentan describir el mecanismo responsable del proceso de fotoactivación<sup>1</sup>. Así se han realizado estudios centrados en evaluar el efecto de tiempos de irradiación con luz o tipo de luz empleada sobre la fotoactivación. Muchos de estos estudios se han llevado a cabo con distintos tipos de QDs o en entornos muy diferentes, por lo que el proceso de fotoactivación puede ser explicado por diferentes vías. Diferentes grupos de investigación trabajando con QDs y ligandos distintos, han obtenido sin embargo resultados experimentales similares, lo que nos lleva a pensar que los procesos de fotoactivación descritos presentan puntos en común.

En términos generales, la esencia de la fotoactivación parece radicar en la eliminación de defectos de la superficie de los QDs, es decir, tendría lugar un suavizado de la superficie de la nanopartícula durante el proceso de fotoactivación<sup>15</sup>. Por otro parte, las moléculas de agua adsorbidas sobre la superficie pueden ayudar al proceso de oxidación de la superficie de la nanopartícula, dando como resultado una reducción en el tamaño de partícula con el consiguiente desplazamiento hacia longitudes de onda más cortas (*desplazamiento hacia el azul*). Esto podría conducir finalmente hacia la aparición de nuevos defectos superficiales que contribuirían a un nuevo decrecimiento de la luminiscencia. La competición entre estos dos tipos de procesos podría explicar el complejo comportamiento del proceso de incremento de la luminiscencia de los QDs en medio acuoso<sup>3</sup>.

No solo el tipo de muestra analizada, sino las condiciones de análisis varían entre unos estudios y otros, o no están bien definidas, lo que hace difícil establecer una comparación entre los datos experimentales recogidos en la bibliografía. Toda esta confusión conduce a pensar que no existe un único mecanismo responsable del proceso de fotoactivación, aunque la mayoría de los autores están de acuerdo en que este incremento se debe a un suavizado de la superficie del QD y con ello la eliminación de los defectos superficiales.

De acuerdo con los resultados recogidos en la bibliografía y laboriosamente clasificados según Carrión<sup>1</sup> y col. se pueden proponer cuatro mecanismos principales para explicar este proceso.

En un *primer* caso se habla de una fotoactivación debida a un calentamiento de la disolución (*photoannealing*) inducido por la luz empleada para la irradiación continua, y contribuyendo al posible templado/recocido de la superficie de la nanopartícula<sup>16</sup>. A través de este proceso se eliminan los enlaces incompletos presentes en la superficie del núcleo de la nanopartícula. Esta explicación para el proceso de fotoactivación únicamente sería viable en el caso de disoluciones de nanopartículas semiconductoras dispersas en disolventes orgánicos y en atmósfera inerte.

Un *segundo mecanismo* explicaría la fotoactivación en base a la adsorción de moléculas de agua sobre la superficie del núcleo de la nanopartícula, pasivando los defectos superficiales e incrementándose así la luminiscencia. Si hay oxígeno presente en disolución el proceso de fotoactivación se acelera, porque se induce a una corrosión del núcleo lo que provoca la liberación de metales<sup>11,17</sup>. El resultado final de todo este proceso es la disminución del diámetro de la nanopartícula, y el consiguiente desplazamiento hacia longitudes de onda más cortas (*hacia el azul*). Tras este proceso puede tener lugar la formación de una capa de Cd(OH)<sub>2</sub>, más favorecida en medio básico<sup>18</sup>.

Otra posible explicación del proceso de fotoactivación propone un reordenamiento de los ligandos hidrófobos (TOP/TOPO) o ligandos que poseen grupos tiol inducido por la acción de la luz. Este reordenamiento reduce el número de defectos de la superficie, disminuyendo así la probabilidad de desactivación a través de procesos no radiacionales.

El último de los mecanismos propuestos postula una relación directa entre el proceso de fotoactivación y la existencia de una fotooxidación de la superficie del nanocrystal en medio acuoso en presencia de oxígeno. En primer lugar tendría lugar

una transferencia fotoinducida de un electrón desde los QDs al oxígeno disuelto en el medio.

Los conductores de carga generados en el QD a partir de la absorción de la luz (*excitón*) activan una serie de reacciones con el oxígeno presente en el medio lo que genera la aparición de especies reactivas de oxígeno. Esta fotooxidación conduce a la erosión de las características no deseables de las nanopartículas lo que mejora la luminiscencia de los QDs, aunque lleva aparejado un ensanchamiento del espectro de emisión y un desplazamiento hacia longitudes de onda más cortas (disminuye el tamaño de nanopartícula y se incrementa la distribución de tamaños).

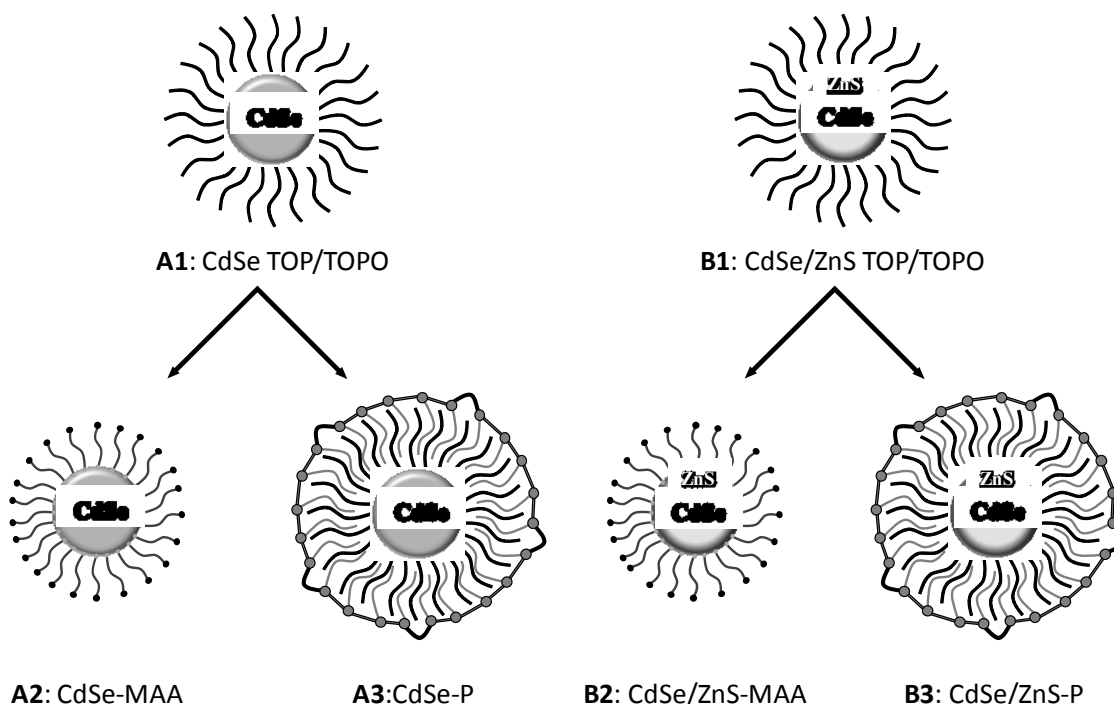
En un esfuerzo por clarificar el proceso de fotoactivación y determinar las rutas de síntesis y las condiciones necesarias para conseguir QDs de alta calidad para aplicaciones luminiscentes, en este trabajo se presenta un estudio detallado del proceso de incremento de la luminiscencia inducido por fotones de QDs de núcleo de CdSe y de núcleo/recubrimiento de CdSe/ZnS sin ningún tipo de modificación superficial (estructura nativa) y con modificación mediante intercambio de ligandos (Ácido Mercaptoacético MAA) o mediante un polímero anfifílico (P).

## D.2.2 Discusión de los resultados

### D.2.2.1 Muestras de QDs coloidales empleadas en el estudio de fotoactivación.

La Figura 39 recoge esquemáticamente la estructura de los diferentes QDs utilizados en el ensayo. En primer lugar, se evaluaron las nanopartículas sintetizadas directamente en medio orgánico (C.3.1), conservando la estructura original de las nanopartículas, ya que únicamente se sometió a los QDs a un proceso de purificación. Los QDs de núcleo de CdSe (Muestra **A1**) y de núcleo/recubrimiento CdSe/ZnS (Muestra **B1**) se dispersaron directamente en cloroformo estabilizados mediante ligandos de trioctilfosfina. Posteriormente a una primera fracción de ambos núcleos de nanopartículas de CdSe y CdSe/ZnS sintetizadas se sometieron a un proceso de solubilización mediante la vía de intercambio de ligandos con ácido mercaptoacético MAA (C.3.3), obteniéndose así la muestra **A2** (CdSe-MAA) y la muestra **B2** (CdSe/ZnS-MAA), las cuales se dispersaron en una disolución reguladora de SBB a pH 12. Para obtener el tercer grupo de muestras se utilizó la segunda fracción de ambos núcleos coloidales sintetizados, y se procedió a su modificación con un polímero anfifílico (PMA75C12) dando lugar a la muestra **A3** (CdSe-P) y la muestra **B3** (CdSe/ZnS-P) estabilizadas mediante la interacción con hidrofóbica entre el polímero y los ligandos

de trioctilfosfina<sup>19</sup> (C.3.4), y posteriormente fueron dispersados nuevamente en la disolución reguladora de SBB de pH 12.



**Figura 39.** Diagrama esquemático de los QDs con distinto núcleo o modificación superficial utilizados a lo largo del estudio de la fotoactivación.

Se registraron las señales de fluorescencia de las distintas disoluciones coloidales a lo largo del estudio de la fotoactivación utilizando para ello el sistema experimental descrito anteriormente (C.3.11.2 *Diseño experimental para el ensayo de fotoactivación de los quantum dots.*) bajo iluminación continua con luz UV a temperatura constante y controlada (Ver Figura 24), exceptuando las medidas de fluorescencia del ensayo de evaluación de la fluorescencia de los radicales que se registraron en el espectrofluorímetro Cary Eclipse (Varian Ibérica).

Como hemos mencionado anteriormente, se ha investigado el proceso de fotoactivación de soluciones coloidales de QDs de CdSe y CdSe/ZnS sin ningún tipo de modificación superficial (conservando su estructura original en medio orgánico) y con la superficie modificada para proporcionar a la nanopartícula solubilidad en medio acuoso. Como era de esperar en todos los casos se observaron incrementos significativos de la emisión luminiscente durante el proceso de irradiación con luz UV.

En primer lugar se constató que el proceso de fotoactivación era independiente de la longitud de onda de excitación de la luz utilizada. Para este propósito, dispersiones coloidales de de QDs CdSe/ZnS-P se expusieron a la radiación

procedente de una lámpara de descarga de Xenón (potencia de pico equivalente a 75 kW) a 300, 350 y 400 nm en el equipo espectrometría de fluorescencia Varian Cary Eclipse (Varian Ibérica). Estas medidas revelaron que la fotoactivación de los QDs es independiente de la longitud de onda de excitación empleada. Por lo tanto, a partir de ese momento se decidió llevar a cabo todos los experimentos de fotoactivación utilizando una lámpara con una emisión a la longitud de onda de 370 nm (lámpara de UV).

A continuación se procedió a evaluar la dependencia del proceso de fotoactivación de la estrategia de solubilización utilizada o bien de la composición del núcleo de los QDs (CdSe o CdSe/ZnS). Las dispersiones coloidales empleadas en el estudio (D.2.2.1) se sometieron a la irradiación continua de las dos lámparas UV modelo F4 T5/BLB durante varias horas dependiendo del tipo de muestra a temperatura ambiente (C.3.11.2 *Diseño experimental para el ensayo de fotoactivación de los quantum dots.*). Como medio de dispersión de nanopartículas se seleccionó cloroformo en el caso de las muestras A1 y B1, y una disolución reguladora de boratos 50 mM de pH 12 en las muestras restantes. El medio básico se seleccionó dada la elevada estabilidad de los QDs en el dicho disolvente (Ver D.1.3.3).

#### **D.2.2.2 Estudio dinámico del proceso de fotoactivación**

Las velocidades dinámicas de evolución de la intensidad de fluorescencia durante el periodo de activación se obtuvieron por medio del ajuste de la respuesta a una función exponencial<sup>7</sup>:

$$I(t) = I_m + A e^{-\left(\frac{t}{\tau}\right)^\beta}$$

**Ecuación 15**

Donde  $I$  es la intensidad de fluorescencia,  $I_m$  es el valor final de la intensidad de emisión de fluorescencia tras el proceso de fotoactivación,  $t$  es el tiempo de fotoactivación, y  $A$  es la variación de la emisión durante la fotoactivación (el valor inicial  $I_0$  menos el valor final  $I_m$ ),  $\tau$  es la constante de tiempo característica del proceso, y  $\beta$  es el parámetro de ajuste, normalmente menor de 1. El valor  $3^{1/\beta\tau}$  es el tiempo necesario para alcanzar el 95% de la variación de la intensidad de emisión, el cual permite comparar los tiempos de respuesta de los diferentes procesos. Jones y col. utilizaron la función anterior para establecer una descripción cuantitativa del proceso de incremento luminescente en el caso de QDs de CdSe/ZnS-TOPO en diferentes disolventes<sup>7</sup>. Los autores suponen que la iluminación continua de las nanopartículas

produce una oxidación y posteriormente una transformación de la superficie de los QDs. Los parámetros  $I_m$ ,  $A$  y  $\beta$  se obtienen ajustando los resultados experimentales (intensidad de fluorescencia normalizada de los QDs en función del tiempo de activación) a la Ecuación 15, y se presentan en la Tabla 3.

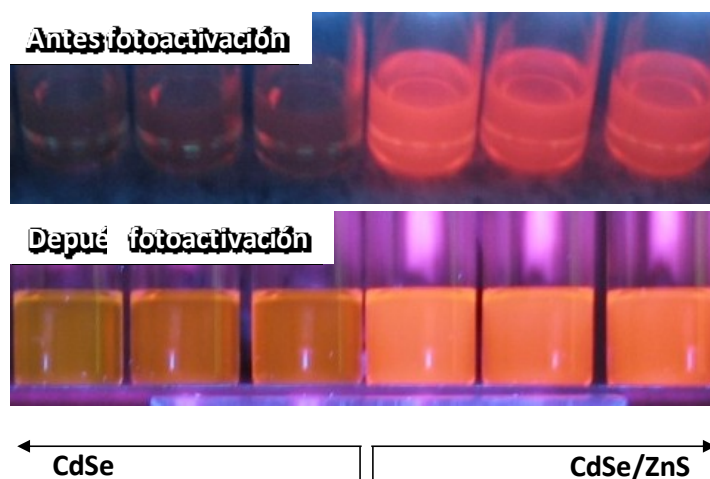
**Tabla 3.** Parámetros extraídos a partir del ajuste de los datos experimentales del proceso de fotoactivación de los QDs coloidales empleados en el estudio.

	$I_m$	$A$	$\tau$ (h)	$\beta$	Tiempo para alcanzar el 95 % fototactivación (h)	$\Delta\lambda_{max}$ durante $\tau$ (nm)	$\Delta\lambda_{max}$ después de $3^{1/\beta\tau}$ (nm)	Incremento luminosidad después de $1/\beta\tau$ (%)
<b>A1</b>	4992,45	-4226,45	6,38	0,96	20,04	4,08	8,84	825
<b>A2</b>	13459,94	-13646,47	10,96	1,06	30,90	7,43	12,51	6935
<b>A3</b>	186,28	-41,84	3,10	1,02	9,10	2,02	3,02	4
<b>B1</b>	53737,51	-52137,80	40,4	1,05	115,02	8,77	11,81	3863
<b>B2<sup>a</sup></b>	53874,63	-53832,28	7,2	0,71	36,84	1,00	1,00	118317
<b>B3</b>	2006,28	-1381,45	2,20	0,67	11,34	3,05	13,24	209

<sup>a</sup> Ajuste después de las tres primeras horas.

Como se puede observar, los distintos QDs presentan rendimientos de fotoactivación que dependen de la naturaleza de la nanopartícula (con presencia o ausencia del recubrimiento de ZnS), el disolvente y la naturaleza de los ligandos que modifican la superficie del núcleo del QD.

Los resultados obtenidos revelan que la capa adicional de ZnS influye en el proceso de fotoactivación. Como ejemplo, en la Figura 40 se muestra una imagen de una serie de viales de vidrio que contienen dispersiones de QDs de CdSe-TOPO y CdSe/ZnS-TOPO todos ellos en cloroformo sin ningún tipo de modificación superficial, antes y después de ser expuestos a la radiación UV. Se observa en todos los casos un incremento de la emisión de luminiscencia después del proceso de fotoactivación, no obstante, los QDs de CdSe/ZnS presentan una emisión detectable a simple vista sin la necesidad de llevar a cabo la fotoactivación previa, mientras que la luminiscencia de los QDs de CdSe no fotoactivados es mucho más débil.



**Figura 40.** Viales de vidrio que contienen dispersiones coloidales de QDs de CdSe y CdSe/ZnS en cloroformo antes y después del proceso de fotoactivación. Fotografía tomada bajo iluminación con luz UV.

La pasivación de la superficie de los QDs con el recubrimiento de un semiconductor de mayor salto de banda, es una estrategia altamente empleada con objeto de eliminar defectos superficiales, y de esta forma incrementar el rendimiento cuántico de la luminiscencia<sup>1</sup>. De ahí que, ya sea en medio orgánico o medio acuoso, el proceso de fotoactivación de los núcleos de CdSe con una capa adicional de ZnS es mucho más intenso en el caso de los núcleos únicamente compuestos por CdSe (Ver Tabla 3). En medio orgánico (cuando no se ha llevado a cabo ningún tipo de modificación sobre la superficie de la nanopartícula), la adición de un paso adicional durante el proceso de síntesis de los QDs para propiciar el crecimiento del recubrimiento de ZnS proporciona unas nanopartículas que requieren mayores tiempos de fotoactivación. Se suele considerar a la fotooxidación como el principal mecanismo responsable del proceso de fotoactivación en disolventes no polares: el recubrimiento de ZnS dificulta la difusión de las moléculas de oxígeno a los núcleos de CdSe<sup>1</sup>. En cambio, se ha observado en medio acuoso que el tiempo necesario para alcanzar el 95% de la variación de la intensidad no presenta diferencias significativas entre las muestras que poseen el recubrimiento adicional de ZnS, y las que no.

Sin embargo, la dinámica del proceso es diferente, ya que el valor del parámetro  $\beta$  está en torno a 0,7 para las nanopartículas con ZnS y, alrededor de 1 para aquellas nanopartículas que no poseen este recubrimiento adicional. Un valor de  $\beta$  próximo a 1



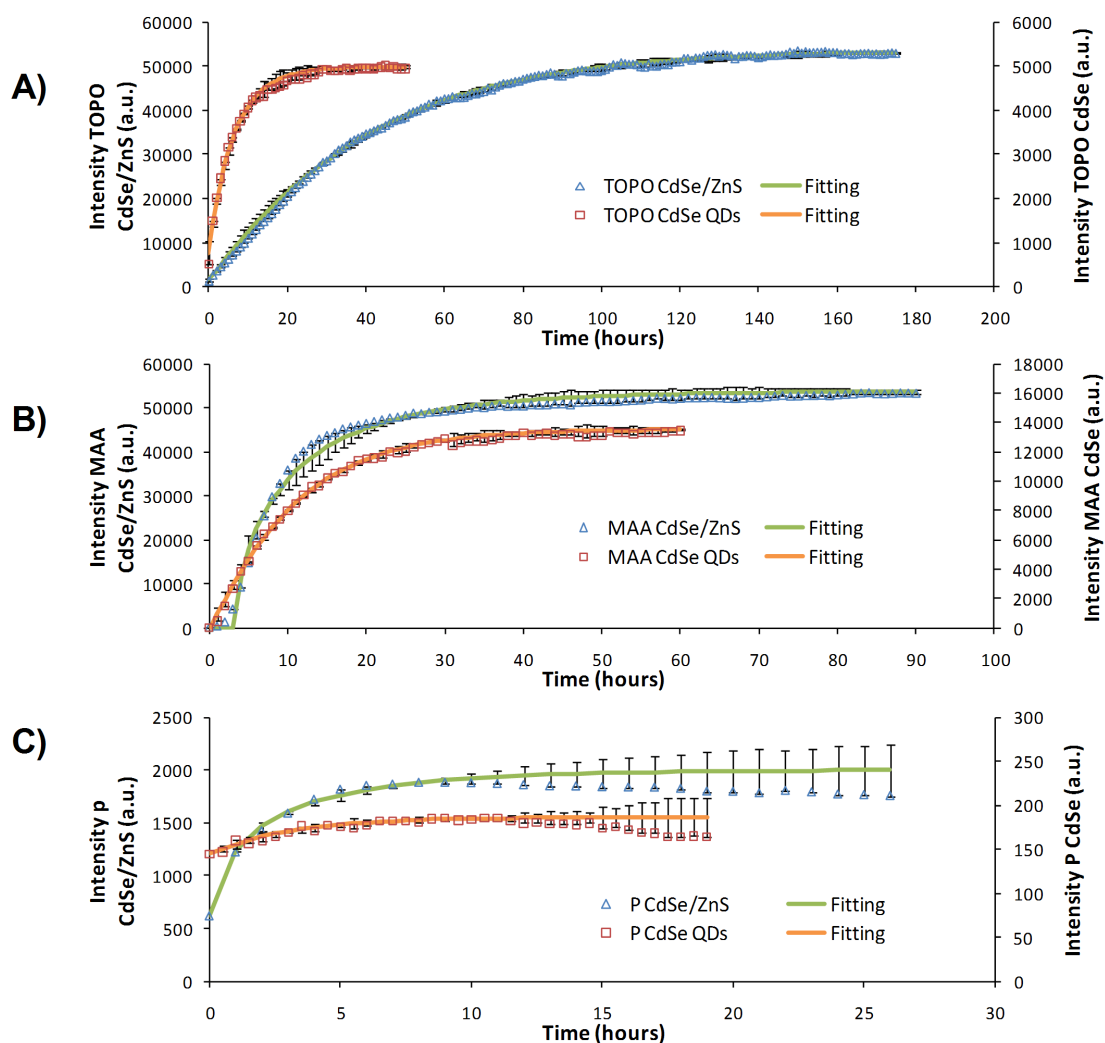
índice que se debe a un proceso de primer orden, el cual se ajusta a una evolución monoexponencial. Los valores de  $\beta$  distintos de 1 se atribuyen a una secuencia de procesos fuertemente acoplados con diferentes velocidades debido a la transformación de la superficie de los QDs de CdSe/ZnS<sup>7</sup>.

Si tenemos en cuenta que las aplicaciones bioanalíticas de los QDs se desarrollan principalmente en medio acuoso, a continuación se resumirán los resultados más relevantes obtenidos después de analizar la dinámica del proceso de fotoactivación de los QDs en agua.

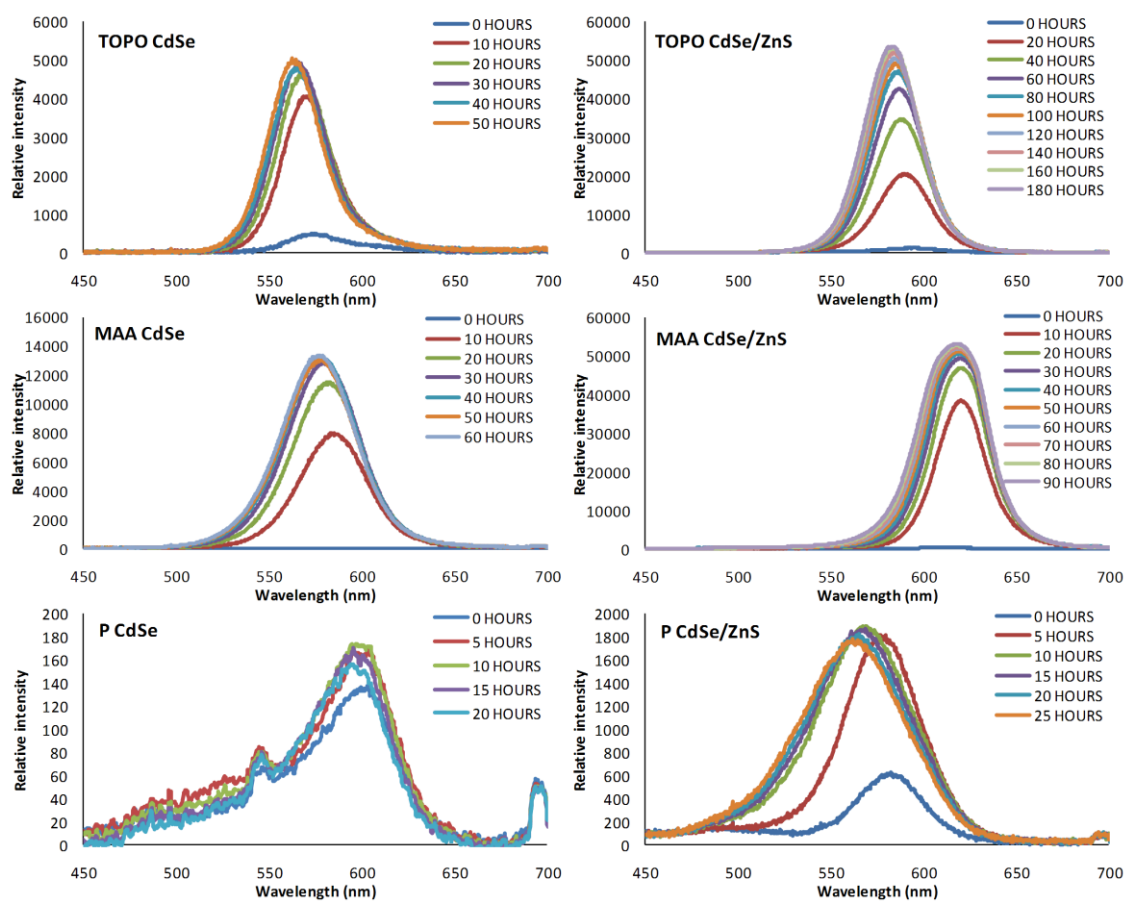
#### D.2.2.2.1 Dinámica del proceso de fotoactivación de los QDs modificados con ligandos bifuncionales (intercambio de ligandos).

Los resultados experimentales obtenidos del estudio del proceso de fotoactivación de nanopartículas de CdSe/ZnS-MAA (B2) muestran un pobre ajuste de los datos experimentales con la Ecuación 15. Concretamente durante las tres primeras horas del proceso de fotoactivación se observa una baja velocidad de fotoactivación (Ver Figura 41 y Figura 42). Ajustando la respuesta de la luminiscencia de la muestra a la Ecuación 15, después de las tres primeras horas, se encontró un valor de  $\beta$  de 0,7. Como se observa en la Figura 43, los QDs que poseen el recubrimiento de ZnS presentan un menor desplazamiento espectral hacia longitudes de onda más cortas después de haberse completado el proceso de fotoactivación. La variación de la intensidad de emisión fluorescente del máximo en comparación con la variación de la longitud de onda del máximo de emisión hasta completar la fotoactivación (Ver Tabla 3) es perceptible incluso cuando el recubrimiento del ZnS forma parte del núcleo, excepto en el caso de los QDs CdSe/ZnS-MAA (muestra B2). En el caso de dicha muestra se detecta por un lado el mayor incremento de la luminiscencia, pero por otro el desplazamiento hacia el azul es el valor más bajo observado. También en este caso obtenemos el valor más pequeño del parámetro  $\beta$ , que junto con la velocidad inicial de fotoactivación sugiere un mecanismo de fotoactivación diferente de la fotooxidación. El elevado salto de banda del material inorgánico adicional empleado para formar el recubrimiento de ZnS en este caso concreto proporciona una capa protectora de la superficie del núcleo que lo hace más resistente a la oxidación, y además contribuye a atrapar al excitón en el núcleo, propiciando así la reducción de los procesos de *quenching* de la luminiscencia causada por los defectos superficiales del CdSe. Además, el recubrimiento que contiene Zn presenta una mayor afinidad por los grupos tiol que

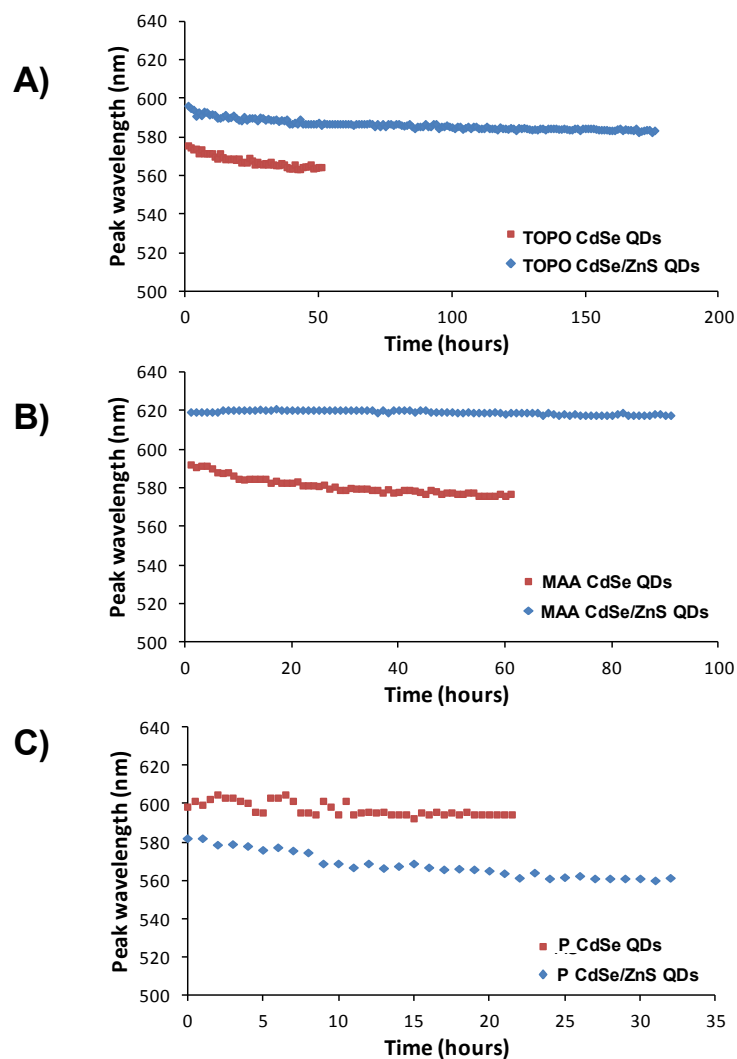
por el núcleo sencillo de CdSe<sup>20</sup>. Ambos efectos pueden explicar la baja velocidad de difusión del oxígeno hacia el núcleo de CdSe (baja velocidad inicial de fotooxidación) observada en este tipo de QDs.



**Figura 41.** Comparación entre las distintas evoluciones de las longitudes de onda del máximo presentadas por QDs de tipo núcleo o núcleo/recubrimiento: a) QDs rodeados de moléculas orgánicas de TOPO en cloroformo; b) QDs-MAA en disolución acuosa; c) QDs-P en disolución acuosa. Se presentan las funciones de ajuste y las barras de error.



**Figura 42.** Evolución de los espectros de fluorescencia de los QDs tipo núcleo y núcleo/recubrimiento (QDs-TOPO en cloroformo, QDs-MAA en disolución acuosa y QDs-P en disolución acuosa).



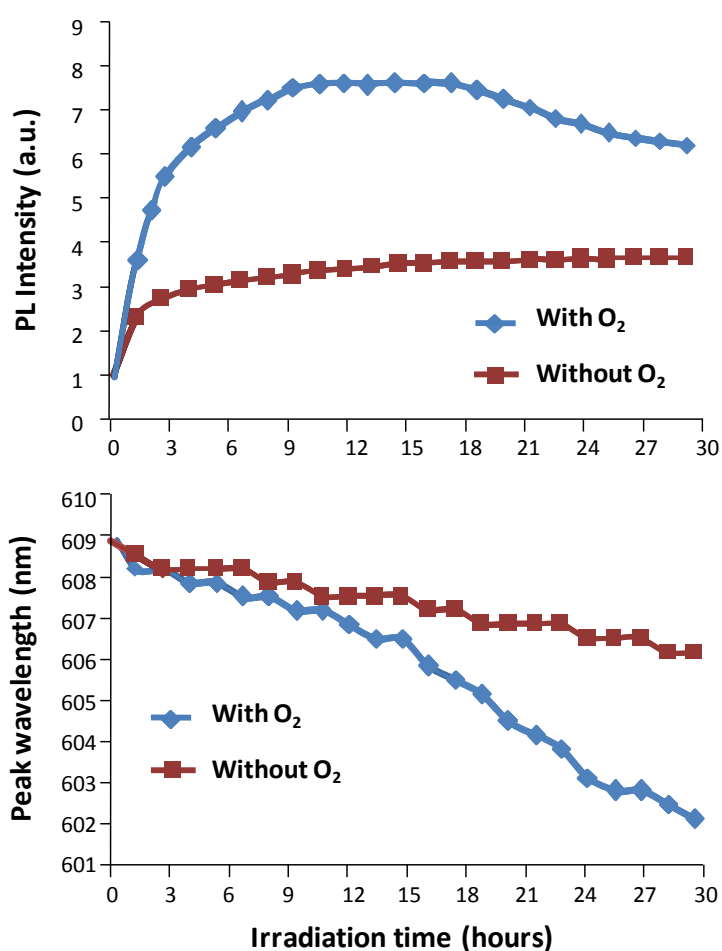
**Figura 43.** Evolución de la longitud de onda del máximo de emisión de los QDs tipo núcleo y núcleo recubrimiento: a) QDs-TOPO en cloroformo; b) QDs-MAA en disolución acuosa; c) QDs-P en disolución acuosa.

#### D.2.2.2.2 Dinámica del proceso de fotoactivación de QDs solubilizados por medio de un recubrimiento polimérico.

Tal y como se observa en la Figura 44 las muestras A3 y B3 presentan un apreciable decrecimiento en la intensidad de fluorescencia después de largos periodos de exposición, aunque en el caso de los QDs CdSe/ZnS-P después de ocho horas de irradiación continua se observa el mayor incremento de la intensidad de emisión, y el máximo desplazamiento hacia el azul. La buena concordancia observada entre los datos experimentales y el ajuste a la función matemática, así como el elevado desplazamiento hacia el azul sugiere que el proceso de fotoactivación de estas

muestras, es resultado principalmente de un proceso de oxidación de la superficie de los QDs.

Con objeto de confirmar la presencia de dicho mecanismo de fotooxidación, nanopartículas modificadas con polímero del tipo CdSe/ZnS-P se sometieron a un proceso de irradiación bajo la acción de una lámpara UV, en presencia de oxígeno primero y luego en ausencia de oxígeno (las muestras acuosas se desoxigenaron con sulfito de sodio<sup>21</sup>). El resultado de la irradiación continua en el caso de ambas muestras de CdSe/ZnS-P (B3), oxigenada y desoxigenada, durante 30 horas se recoge en la Figura 44.



**Figura 44.** Evolución de la intensidad de luminiscencia y desplazamiento hacia el azul de los QDs de CdSe/ZnS-P en presencia y ausencia de oxígeno disuelto en el medio.

La mayor eficacia observada en la fotoactivación de los CdSe/ZnS-P (tal y como se deduce analizando la intensidad de fluorescencia y el desplazamiento espectral del máximo en la Figura 44) tiene lugar en presencia de oxígeno. La muestra de CdSe/ZnS-P dispersada en el disolvente desoxigenado presenta un grado de

fotoactivación inferior, poniendo así de manifiesto el papel clave del oxígeno durante el proceso de fotoactivación de los QDs.

Estudios preliminares han sugerido que el desplazamiento hacia el azul de los espectros de emisión a menudo indica un cambio en la polaridad del entorno de la nanopartícula o bien, el decrecimiento del tamaño de la nanopartícula (en este último caso implicaría la consiguiente liberación de iones metálicos desde el QDs al disolvente). Después de la oxidación de la superficie de la nanopartícula cabe esperar una disminución del tamaño de la nanopartícula debido a la desorción de especies del núcleo como  $\text{SeO}_2$  y  $\text{SO}_4$ , acompañado por la liberación de iones de  $\text{Zn}^{2+}$  y  $\text{Cd}^{2+}$  a la disolución desde la superficie de la nanopartícula.

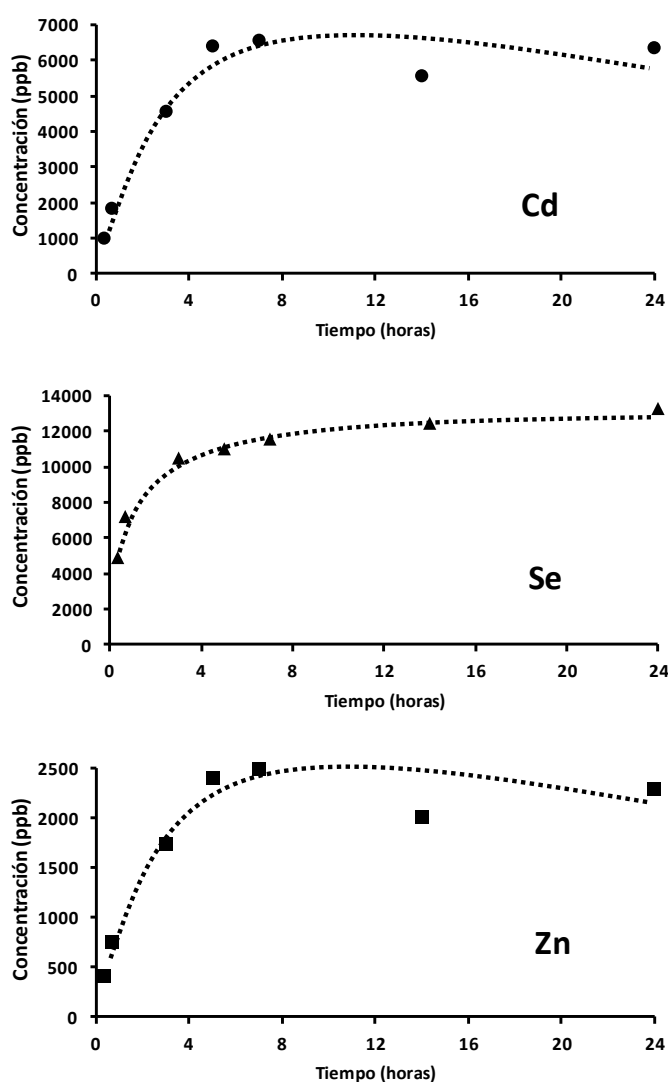
Con objeto de profundizar en el estudio del papel de la oxidación de la superficie de la nanopartícula, se hizo uso de la técnica de ICP-MS (*C.3.9 Protocolo de medida de metales libres en disoluciones de quantum dots por ICP-MS.* ) para estudiar la potencial liberación de Cd, Se y Zn a medida que se desarrolla el proceso de fotoactivación (con el tiempo de irradiación). Para ello, suspensiones coloidales de CdSe/ZnS-P se expusieron continuamente a radiación UV, mientras que a determinados intervalos de tiempo de irradiación se recogían alícuotas de dichas muestras irradiadas. Las alícuotas fueron posteriormente centrifugadas para separar las nanopartículas del disolvente. Los posibles cambios en la concentración de metales liberados pueden ser monitorizados a través de la medida en las alícuotas de disolvente obtenidas tras la centrifugación por medio de ICP-MS.

Por ello, dichas disoluciones fueron analizadas en busca de la presencia de Cd, Se, y Zn libre. Los resultados obtenidos se pueden ver en la Figura 45. A partir de las medidas de ICP-MS podemos afirmar que parece tener lugar una oxidación significativa de la superficie de la nanopartícula durante el proceso de irradiación, como revela el incremento en la concentración de los tres metales monitorizados a medida que se incrementa el tiempo de irradiación. Se observó que después de ocho horas la concentración de metales en las muestras de sobrenadantes alcanzan un valor constante (aparentemente el proceso de fotoactivación se reduce progresivamente). El hecho de que se observe un desplazamiento espectral durante el proceso de fotoactivación, y éste se presente conjuntamente con un incremento de la concentración de metal libre en disolución, indica que el mecanismo más probable en este caso del proceso de fotoactivación sea la fotooxidación.

Finalmente, como hemos comentado anteriormente, en el caso de las muestras de CdSe-P y CdSe/ZnS-P se observa un descenso de su emisión fluorescente (después de una primera fase de fotoactivación inicial por la acción de la luz UV) evidente. Este hecho puede ser relacionado con la potencial degradación del recubrimiento polimérico (P) que poseen estas muestras, lo que puede dar como resultado final la variación de la superficie del QD. Quizás la generación de radicales estimulada por la irradiación con luz UV y catalizada por la propia presencia de los QDs<sup>22</sup>, puede explicar la degradación del polímero orgánico. De hecho, la irradiación de los QDs nanocristalinos conduce a la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS Reactive Oxygen Species) en disolución acuosa<sup>22</sup>. La producción de especies reactivas de oxígeno desencadenada por la luz provoca la descomposición de la capa de polímero estabilizante de ambos tipos de núcleos en medio acuoso en el caso de las muestras de QDs-P. Siguiendo esta idea se decidió proceder al estudio de la posible generación de radicales hidroxilo durante el proceso de irradiación con luz UV, eligiéndose como muestra modelo los QDs de CdSe/ZnS-P.

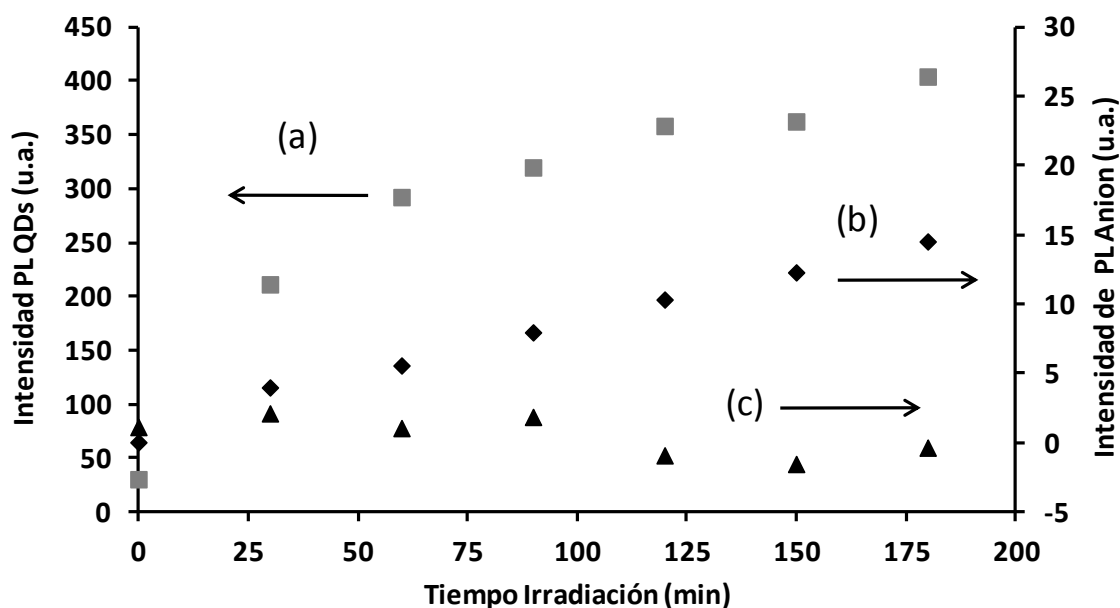
La presencia de dichos radicales en el medio se monitorizó a través de un ensayo fluorescente<sup>23</sup> (*C.3.8 Ensayo fluorimétrico para evaluar la presencia de radicales libres "hidroxilo" en disolución.*) y empleando la espectroscopia de emisión fluorescente (Varian Cary Eclipse) para monitorizar la posible formación del producto fluorescente 2-hidroxitereftalato ( $\lambda_{\text{ex}} \sim 320$  nm;  $\lambda_{\text{em}} \sim 425$  nm) en presencia de los QDs bajo la acción de la luz UV para estimular la fotoactivación de las nanopartículas. Paralelamente también se registró la fluorescencia correspondiente a los propios QDs ( $\lambda_{\text{em}} 590$  nm) presentes en la muestra. Como muestra control se utilizó una disolución que contiene los mismos componentes que la muestra ya analizada, exceptuando los propios núcleos de CdSe/ZnS de la nanopartícula. Los resultados obtenidos a lo largo del estudio se recogen a lo largo de la Figura 46. En la Figura 46 a) se representa la variación de la intensidad de emisión de los QDs-P (medida a la longitud de onda de emisión de los QDs 587 nm) que están siendo fotoactivados por irradiación con luz de longitud de onda de 365 nm. Como era de esperar, existe un incremento en la intensidad de emisión de los QDs con el tiempo de irradiación de la muestra (CdSe/ZnS-P en presencia de tereftalato de sodio 0.1 M no fluorescente). Además, como en la Figura 46 b), se observa como paralelamente a la fotoactivación de los QDs se genera 2-hidroxitereftalato, lo que confirma el hecho de que radicales hidroxilo están siendo generados durante el proceso de irradiación con luz UV. Los resultados del

ensayo fluorimétrico en el caso de la muestra control (preparada en las mismas condiciones que la anterior pero en ausencia de QDs) que únicamente contiene tereftalato de sodio y el polímero empleado en la solubilización de la nanopartícula, se pueden ver en la Figura 46 c). La muestra control no presenta fluorescencia significativa lo que indica que no existe generación de radicales libre en ausencia de los núcleos de los QDs. En resumen, se comprobó que el recubrimiento polimérico presenta una degradación apreciable, provocada por la generación de radicales.



**Figura 45.** Medidas de ICP-MS de los iones  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Se}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  liberados de a partir del núcleo de los QDs a medida que se incrementa el tiempo de irradiación.





**Figura 46.** Efecto de la irradiación de la luz UV sobre a) emisión de luminiscencia de los QDs-P en suspensión coloidal; b) emisión de luminiscencia del anión 2-hidroxiterephthalato en presencia de QDs-P; c) emisión de luminiscencia de anión 2-hidroxiterephthalato en presencia de polímero libre (el mismo polímero utilizado para la solubilización de los QDs) pero si QDs.

Para terminar podemos concluir que a lo largo de este estudio sobre la fotoactivación, y a través de la interpretación de los cambios de intensidad y posición espectral de la emisión luminiscente de los QDs durante el proceso de fotoactivación se puede obtener información útil, tanto desde el punto de vista de controlar la síntesis de nanocristales de alta calidad, como de obtener información valiosa sobre la química superficial de las nanopartículas y también sobre los mecanismos implicados en la interacción con la superficie de reacción.

En este estudio hemos recogido numerosos datos cuantitativos (p. ej. intensidades de luminiscencia, parámetro de ajuste, velocidades de fotoactivación, variaciones del máximo de emisión, etc.) para QDs con diferente tipo de modificación.

A pesar de los numerosos datos obtenidos, el ajuste de los datos experimentales a una ecuación matemática ha facilitado establecer una comparación entre las distintas muestras, tratando de localizar comportamientos similares o dispares, así como conocer cada tipo de muestra un poco más en profundidad para posteriormente, seleccionar el tipo de QDs modificados más adecuados para una aplicación bioanalítica determinada. Este estudio se ha hecho desde una perspectiva distinta, basándonos en el análisis del comportamiento dinámico del proceso de fotoactivación.

Los resultados son de gran interés para aplicaciones de los QDs como marcadores en aplicaciones biomédicas, ya que la degradación de un tipo de nanopartícula concreto después de un tiempo de irradiación largo puede ser estimada.

De forma experimental se comprobó que el proceso de fotoactivación depende en gran medida de la propia composición de los QDs (p. ej. la presencia o ausencia del recubrimiento adicional de ZnS o bien del tipo de modificación superficial). En relación con la dinámica del proceso, los resultados indican que este puede llegar a ser más complejo después del proceso de modificación superficial (p. ej. con ácido mercaptoacético o polímero) y la fotooxidación parece tener un papel principal en el proceso de fotoactivación observado. La demostración experimental de que tal proceso de fotooxidación tiene lugar durante la fotoactivación está avalado por el hecho de que el tamaño del núcleo de la nanopartícula se reduce (confirmado a través del desplazamiento espectral hacia el azul), y por la concentración de iones metálicos libres en disolución liberados a partir del núcleo de la nanopartícula durante la irradiación UV (la concentración de iones libres se incrementa en los sobrenadantes con el tiempo de irradiación).

En gran medida en el caso de los QDs modificados con el polímero anfifílico dan como resultado un importante decrecimiento de la intensidad de fluorescencia después de un tiempo de irradiación prolongado. Este hecho puede ser racionalizado en términos de formación reactiva de radicales, la cual podría acelerar la degradación del polímero orgánico, y por tanto propiciar la posible agregación de nanopartículas y la correspondiente pérdida de luminiscencia de los QDs.

### D.2.3 Referencias

<sup>1</sup> C. Carrillo-Carrión, S. Cárdenas, B. M. Simonet, M. Valcarcel, **Quantum Dots luminescence enhancement due to illumination with UV/Vis light**. *Chemical Communications*, 2009, 35, 5214-5226.

<sup>2</sup> B. Zhang, X. Gong, L. Halo, J. Cheng, Y. Han, J. Chang, **A novel method to enhance quantum yield of silica-coated quantum dots for biodetection**. *Nanotechnology*, 2008, 19, 465604-

<sup>3</sup> S. R. Cordero, P. J. Carson, R. A. Estabrook, G. F. Strouse, S. K. Buratto, **Photo-activated luminescence of CdSe Quantum Dot Monolayers**. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2000, 104, 51, 12137-12142.

- <sup>4</sup> A. M. Derfus, W. C. W. Chan, S. N. Bhatia, **Probing the cytotoxicity of semiconductor quantum dots**. *Nano Letters*, 2004, 4, 1, 11-18.
- <sup>5</sup> L. Manna, E. C. Scher, L-S. Li, A. P. Alivisatos, **Epitaxial growth and photochemical annealing of graded CdS/ZnS shells on colloidal CdSe nanorods**. *Journal of the American Chemical Society*, 2002, 124, 24, 7136-7145.
- <sup>6</sup> Z. Zhelev, R. Jose, T. Nagase, H. Ohba, R. Bakalova, M. Ishikawa, Y. Baba, **Enhancement of the photoluminescence of CdSe quantum dots during long-term UV-irradiation: privilege or fault in life science research?**. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2004, 75, 99-105.
- <sup>7</sup> M. Jones, J. Nedeljkovic, R. J. Ellingson, A. J. Nozik, G. Rumbles, **Photoenhancement of luminescence in colloidal CdSe quantum dot solutions**. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2003, 107, 11346-11352.
- <sup>8</sup> N. E. Korsunskaya, M. Dybiec, L. Zhukov, S. Ostapenko, T. Zhukov, **Reversible and non-reversible photo-enhanced luminescence in CdSe/ZnS quantum dots**. *Semiconductor Science and Technology*, 2005, 20, 876-881.
- <sup>9</sup> A. A. Bol, A. Meijerink, **Luminescence quantum efficiency of nanocrystalline ZnS:Mn<sup>2+</sup>. 2 Enhancement by UV irradiation**. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2001, 105, 10203-10209.
- <sup>10</sup> J. J. Peterson, T. D. Krauss, **Photobrightening and photodarkening in PbS quantum dots**. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2006, 8, 3851-3856.
- <sup>11</sup> Y. Wang, Z. Tang, M. A. Correa-Duarte, I. Pastoriza-Santos, M. Giersig, N. A. Kotov, L. M. Liz-Marzán. **Mechanism of strong luminescence photoactivation of citrate-stabilized water-soluble nanoparticles with CdSe cores**. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2004, 108, 15461-15469.
- <sup>12</sup> M. T. Fernández-Argüelles, W. J. Jin, J. M. Costa-Fernández, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, **Surface-modified CdSe quantum dots for the sensitive and selective determination of Cu(II) in aqueous solutions by luminescent measurements**. *Analytica Chimica Acta*, 2005, 549, 20-25.
- <sup>13</sup> A. Shavel, N. Gaponik, A. Eychmüller, **Efficient UV-blue photoluminescing thiol-stabilized water soluble alloyed ZnSe(S) nanocrystals**. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2004, 108, 5905-5908.
- <sup>14</sup> J. Ma, J-Y. Chen, J. Guo, C. C. Wang, W. L. Yang, L. Xu, P. N. Wang, **Photostability of thiol-capped CdTe quantum dots in living cells: the effect of photo-oxidation**. *Nanotechnology*, 2006, 17, 2083-2089.
- <sup>15</sup> S. Dembski, C. Graf, R. Krüger, U. Gbureck, A. Ewald, A. Bock, E. Rühl, **Photoactivation of CdSe/ZnS Quantum Dots embedded in silica colloids**. *Small*, 2008, 4, 9, 1516-1526.

- 
- <sup>16</sup> Q. Cai, H. Zhou, F. Lu, **Enhanced infrared response of Si base p-n diode with self-assembled Ge quantum dots by thermal annealing.** *Applied Surface Science*, 2008, 254, 3376-3379.
- <sup>17</sup> Y. Wang, Z. Tang, M. A. Correa-Duarte, L. M. Liz-Marzán, N. A. Kotov, **Multicolor luminescence patterning by photoactivation of semiconductor nanoparticle films.** *Journal of the American Chemical Society*, 2003, 125, 2830-2831.
- <sup>18</sup> H. Bao, Y. Gong, Z. Li, M. Gao, **Enhancement effect of illumination on the photoluminescence of water-soluble CdTe nanocrystals: Toward highly fluorescent CdTe/CdS core-shell structure.** *Chemistry of Materials*, 2004, 16, 3853-3859.
- <sup>19</sup> M. T. Fernández-Argüelles, A. Yakovlev, R. A. Sperling, C. Luccardini, S. Gaillard, A. Sanz-Medel, J-M. Mallet, J-C. Brochon, A. Feltz, M. Oheim, W. J. Parak, **Polymer-coated quantum dots with integrated acceptor dyes as FRET-based nanoprobos.** *Nano Letters*, 2007, 7, 9, 2613-2617.
- <sup>20</sup> A. F. E. Hezinger, J. Tebmar, A. Göpferich, **Polymer coating of quantum dots- A powerful tool toward diagnostics and sensorics.** *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2008, 68, 1, 138-152.
- <sup>21</sup> M. E. Díaz-García, A. Sanz-Medel, **Facile chemical deoxygenation of micellar solutions for room temperatura phosphorescence.** *Analytical Chemistry*, 1986, 58, 7, 1436-1440.
- <sup>22</sup> R. Bakalova, H. Ohba, Z. Zhelev, R. Nagase, R. Jose, M. Ishikawa, Y. Baba, **Quantum Dot anti-CD conjugates: Are they potential photosensitizers or potentiators of classical photosensitizing agents in photodynamic therapy of cancer?** *Nano Letters*, 2004, 4, 9, 1567-1573.
- <sup>23</sup> V. Rajendran, M. Lehnig, C. M. Niemeyer, **Photocatalytic activity of colloidal CdS nanoparticles with different capping ligands.** *Journal of Materials Chemistry*, 2009, 19, 6348-6353.



## D.3 INMOVILIZACIÓN DE QDS EN UN SOPORTE SÓLIDO: DESARROLLO DE FASES SENSORAS LUMINISCENTES.

### D.3.1 Antecedentes y objetivos

La síntesis de QDs luminiscentes mediante la química coloidal es la vía más simple y adecuada para producir semiconductores cristalinos de alta calidad. Sin embargo, su empleo en el diseño de un dispositivo sensor requiere que estas nanopartículas luminiscentes indicadoras sean inmovilizadas en una matriz sólida apropiada.

La inmovilización de moléculas indicadoras luminiscentes sobre un soporte sólido rígido (para el desarrollo de fases sensoras luminiscentes) se ha llevado a cabo a través de diversas técnicas. Así, entre los soportes sólidos tradicionalmente empleados se incluyen sílica gel, resinas poliméricas de distinta naturaleza, soportes de celulosa, zeolitas, etc. El soporte sólido influye de manera decisiva sobre la eficiencia cuántica del luminóforo inmovilizado, sobre su estabilidad y sobre la capacidad de interacción del indicador con el analito, de modo que la selección del soporte sólido adecuado puede no resultar sencilla. Por esto, un aspecto de permanente interés es la búsqueda de materiales con prestaciones apropiadas que permitan la inmovilización de luminóforo, manteniendo intactas sus propiedades espectroscópicas y asegurando una elevada estabilidad y alto grado de respuesta frente a la presencia del analito.

Teniendo en cuenta las excepcionales propiedades de los QDs como nuevos luminóforos, un paso crucial hacia el desarrollo de nuevos sensores luminiscentes basados en QDs consiste en la inmovilización de las nanopartículas sobre una superficie sólida<sup>1</sup>. Se han desarrollado ya algunas aplicaciones empleando QDs inmovilizados sobre un soporte o superficie sólida para la medida de temperatura o para la detección de iones, aunque la mayoría de estos desarrollos emplean micro o nanoestructuras poliméricas dopadas con QDs. En estas aplicaciones no se suelen generar materiales dopados a escala macroscópica más adecuados para su empleo en plataformas sólidas como fibras ópticas. Otras alternativas para la inmovilización incluyen la deposición de las nanopartículas sobre sustratos empleando técnicas de autoensamblado que permiten un mejor control sobre el espesor de la película formada.

En este contexto los materiales sol-gel son muy versátiles y permiten la encapsulación de los indicadores dentro de una matriz porosa. Ya se han propuesto algunos procedimientos para el dopaje de materiales con QDs<sup>2</sup>, no obstante, alcanzar la inmovilización de las nanopartículas en un soporte sólido mientras se mantienen las propiedades ópticas no es un tarea sencilla. A menudo aparecen problemas relacionados con la propia sensibilidad de los QDs al entorno que los rodea o la escasa estabilidad del sistema generado. Además se ha contemplado la posibilidad de llevar a cabo la síntesis de la nanopartícula directamente en el interior de la matriz sólida, no obstante en este caso se favorece la agregación de las nanopartículas y por tanto el ensanchamiento espectral.

Se han obtenido distintos materiales luminiscentes dopando los sol-geles con QDs pero estos son más adecuados para aplicaciones en células solares, dispositivos electrónicos o láser. Sin embargo, la implementación de sensores o biosensores utilizando sol-geles dopados con QDs ha sido limitada, por lo que se sigue trabajando en la búsqueda de procedimientos de inmovilización robustos y que proporcionen un material estable. A raíz de la experiencia de nuestro Grupo de Investigación en el trabajo con sol-geles esta fue la vía elegida para el estudio de la inmovilización de QDs en un soporte sólido a lo largo del presente capítulo.

### **D.3.1.1 Tecnología sol-gel en el desarrollo de sensores fotoluminiscentes.**

Los materiales inorgánicos preparados según la tecnología sol-gel han demostrado poseer unas excepcionales propiedades que los hacen especialmente apropiados para la fabricación de materiales de buena calidad óptica<sup>3</sup>. En el campo de los sensores luminiscentes este tipo de matrices sólidas ha sido ampliamente utilizado en el desarrollo de fases sensoras, buscando aunar las ventajas tradicionales de los soportes inorgánicos (rigidez, estabilidad, durabilidad, etc.) con la versatilidad que ofrecen los polímeros orgánicos en cuanto a la variedad de monómeros, rutas de síntesis, etc. En efecto, la tecnología sol-gel permite preparar matrices inorgánicas altamente porosas, a temperatura ambiente y en presencia de uno o varios luminóforos indicadores, a través de polimerizaciones y coagulaciones de hidróxidos, alcóxidos o esteres de metal. El hecho de que la síntesis pueda llevarse a cabo a temperatura ambiente evita los procesos de degradación y fusión tradicionales que tienen lugar en la síntesis de los materiales inorgánicos más habituales típicamente obtenidos a partir de procesos llevados a cabo a elevadas temperaturas (vidrios, cerámicos) que podrían

descomponer a las moléculas indicadoras. Además, las características de la matriz en términos de rigidez, composición y porosidad pueden variarse dentro de un amplio intervalo, simplemente variando la composición de mezcla de precursores, lo que permite disponer de un amplio abanico en el diseño y estructura de los sol-geles. Asimismo, los sol-geles presentan una elevada transparencia óptica, y elevada estabilidad mecánica y química, de ahí que su uso en el desarrollo de fases luminiscentes se haya popularizado.

La síntesis de un material sol-gel se basa en el empleo de alcóxidos de metales, normalmente de silicio. La mayor parte de las técnicas preparativas de sol-gel emplean tetraalcóxidos de bajo peso molecular como precursores, principalmente el TMOS (*tetrametoxisilano*), MTMOS (*metiltrimetoxisilano*) o el TEOS (*tetraetoxisilano*) para producir la suspensión tipo coloide (*sol*), que posteriormente condensará (*gel*). Junto con estos monómeros básicos, también existe la posibilidad de emplear otra variedad de organosilicatos con distintos grupos funcionales que permitan modificar la estructura y propiedades de la matriz inorgánica preparada. En el proceso de obtención de un sol-gel las principales reacciones químicas involucradas son las siguientes:

1) En primer lugar se produce una reacción de *hidrólisis* de los monómeros en presencia de agua y de un catalizador ácido o básico. Es frecuente que junto al agua se añadan disolventes orgánicos (p. ej.: THF, alcoholes, etc.) que ayuden a la solubilización y mezcla homogénea de los alcoxisilanos ( $-Si-OR + H_2O \rightarrow Si-OH + ROH$ ).

2) A continuación tiene lugar un proceso de *condensación*, mediante la formación de enlaces siloxano ( $Si-O-Si$ ) entre los monómeros hidrolizados ( $-Si-OR + Si-OH \rightarrow Si-O-Si + ROH$ ).

3) Posteriormente se produce una *agregación* de los siloxanos formados, aumentando la viscosidad del medio y originándose como resultado una estructura porosa denominada *gel*. Las características de este gel continúan cambiando mientras queden disolventes y agua en la estructura, debido a reacciones de policondensación.

4) Tras una etapa de *secado*, se obtiene como producto final un *gel poroso*. Lo más común es que el secado se lleve a cabo a temperatura ambiente o moderada, y a presión atmosférica; por tanto, lo habitual es sintetizar *xerogeles*, si bien es un proceso más lento que en el caso de emplear en la etapa de secado p. ej. fluidos supercríticos que darían lugar a *criogeles*. Durante el secado, los disolventes contenidos en los poros



de mayor diámetro se evaporarán primero que aquellos contenidos en poros de menor diámetro, originándose unos gradientes de presión que pueden ocasionar la ruptura del xerogel<sup>4</sup>.

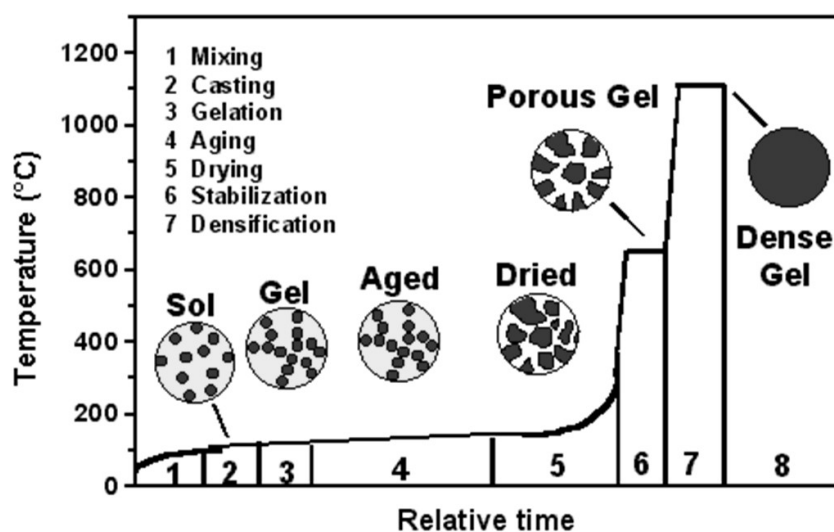


Figura 47. Esquema representativo del proceso sol-gel.

#### D.3.1.2 Variables experimentales proceso sol-gel.

Existen una serie de variables que gobiernan el proceso sol-gel y el resultado final del material obtenido: la *naturaleza y concentración* de los *precursores* empleados en la polimerización, *pH*, *temperatura*, *presión*, *tiempo de reacción*, *disolvente orgánico* empleado, tipo y concentración del *catalizador*, *relación molar agua/silicio* y tiempo de *secado*. Todas estas variables pueden ser optimizadas para controlar las propiedades del sol-gel final como: la porosidad, superficie específica y concentración de grupos silanol libres en la superficie. No obstante, no es sencillo predecir la relación existente entre estas variables y las propiedades del sol-gel final, ya que existen numerosas interdependencias entre las mismas. Lograr un material con unas propiedades apropiadas para una aplicación concreta suele conllevar un proceso tedioso de síntesis de prueba y error. Sin embargo, de entre todos los parámetros mencionados anteriormente, los de mayor influencia sobre las propiedades finales son: el *tipo de catálisis* empleada (ácida o básica), la *relación molar agua/silicio* y el volumen del disolvente orgánico utilizado.

a) El *tipo de catálisis* controla la superficie específica y la distribución del tamaño de los poros del xerogel final; una catálisis básica origina sol-geles de elevada

superficie específica (mesoporosos) mientras que una catálisis ácida origina sol-geles microporosos (menor superficie específica).

b) Las *relaciones molares agua/silicio* bajas disminuyen la velocidad de la etapa de hidrólisis, dando lugar a estructuras poco entrecruzadas; las relaciones más elevadas mejoran la porosidad y la superficie específica del sol-gel final.

c) Utilizar un elevado *volumen de disolvente orgánico* disminuye la tendencia a la agregación de los monómeros coloidales generados en la hidrólisis y condensación, lo que incrementa la porosidad del producto final. En el empleo de la tecnología sol-gel para la preparación de fases sensoras luminiscentes hay que tener presente que por una parte la matriz debe retener de forma eficaz el indicador luminiscente inmovilizado, pero por otro lado debe ofrecer la máxima accesibilidad posible al analito de interés (elevada porosidad) para que tenga lugar la interacción rápida con el indicador atrapado en la matriz sólida.

#### **D.3.1.3 Ventajas e inconvenientes de los materiales sol-gel.**

Las matrices obtenidas mediante la tecnología sol-gel proporcionan una serie de *ventajas* frente a otros soportes sólidos empleados tradicionalmente en el desarrollo de “superficies activas” para sensores ópticos. En primer lugar muestran una excelente transparencia óptica a la par que una baja fluorescencia intrínseca, lo que resulta muy adecuado para aplicaciones espectrofotométricas. Además, los sol-geles presentan una elevada rigidez física que se traduce en una elevada resistencia frente a la deformación mecánica, mientras que por otro lado las suaves condiciones de síntesis posibilitan la inclusión en su estructura de reactivos sensibles como proteínas o enzimas<sup>5</sup>. Igualmente los sol-geles son inertes químicamente (lo que supone una baja interacción con los analitos) y no suelen producirse deformaciones ni lixiviados al sumergir estos materiales en medios acuosos u orgánicos. Por todo esto, los materiales sol-gel se presentan como una buena alternativa para ser utilizados como soporte sólido en el desarrollo de sensores ópticos (entre ellos luminiscentes), aunque tampoco están exentos de ciertos *inconvenientes*. En caso de trabajar a pH extremos los enlaces entre los ortosilicatos pueden hidrolizarse, o bien el material obtenido puede presentar tiempos de respuesta largos por la lenta difusión de los analitos. Un aspecto poco deseable es la modificación de las propiedades espectroscópicas o químicas de la molécula a inmovilizar o problemas de lavado del reactivo inmovilizado.

### **D.3.1.4 Métodos de inmovilización de especies químicas en matrices sol-gel.**

Los métodos más empleados para abordar la inmovilización de un compuesto químico en una matriz sol-gel son: *inmovilización química, copolimerización de agentes modificados, técnicas de impregnación, dopaje químico.*

En la *inmovilización química* se establecen enlaces covalentes entre el compuesto a inmovilizar y los grupos silanol, por lo que es un proceso muy específico, y por tanto poco extendido.

Durante la *polimerización con agentes modificados* lo que se utilizan son monómeros de alcoxisilanos modificados, que contienen algún agente orgánico enlazado covalentemente. Este método proporciona un elevado grado de inmovilización del reactivo de interés (reducción lixiviaciones), no obstante es un método poco general ya que es preciso realizar la síntesis del precursor modificado con el consiguiente aumento de la complejidad.

El tercer método (*técnica de impregnación*) se basa sencillamente en sumergir el soporte poroso en una disolución concentrada del luminóforo a retener, inmovilizándose de esta forma por adsorción. En este último caso los problemas surgen por el lavado de nuestro luminóforo con el tiempo, ya que los enlaces formados son de naturaleza débil.

Finalmente, la *estrategia del dopaje químico* incorpora al luminóforo activo a la mezcla de los precursores antes de que tenga lugar la reacción de polimerización, de esta forma nuestro luminóforo quedará atrapado en el sol-gel durante el proceso de formación de la matriz. Este es el método más utilizado por su sencillez, aunque una parte importante de las moléculas inmovilizadas puedan permanecer poco accesibles para el analito, con lo que se incrementarían los tiempos de respuesta del sensor. Asimismo, la estrategia de “dopaje” de sol-geles permite sintetizar de manera muy sencilla matrices inorgánicas conteniendo bien moléculas orgánicas, proteínas o distintos compuestos químicos en su estructura.

En este contexto la estrategia de dopaje de sol-geles podría permitir la incorporación de QDs coloidales (sintetizados previamente) en una estructura sol-gel simplemente añadiendo las nanopartículas luminiscentes a la disolución precursora de la matriz sol-gel<sup>6</sup>. Esta estrategia alternativa a llevar a cabo la síntesis del nanomaterial directamente en el interior del material sol-gel favorecería un mayor control sobre la síntesis de la nanopartícula y las propiedades del nanomaterial final obtenido.

### **D.3.1.5 Objetivo.**

Por todo esto, el **objetivo** a abordar a lo largo del presente capítulo de Tesis Doctoral consistió, en primer lugar, en la búsqueda y selección de un soporte sólido que permitiese inmovilizar los QDs mediante un procedimiento sencillo manteniendo sus propiedades luminiscentes. Dadas las excelentes propiedades que poseen las matrices sol-gel, se evaluaron matrices preparadas a partir de alcóxidos funcionalizados que permitan la inmovilización del QDs dentro de la estructura polimérica del sol-gel, evitando asimismo procesos de lixiviación o de modificación de las propiedades luminiscentes de los nanocristales.

Posteriormente a partir de esta plataforma de inmovilización se persiguió el desarrollo de una fase sensora luminiscente basada en un proceso de transferencia de energía (FRET). Se pretende lograr las condiciones necesarias para favorecer el proceso de transferencia de energía (FRET) desde los QDs fluorescentes (actuando como donador) hacia un aceptor adecuado mediante la co-inmovilización del aceptor y del QD conjuntamente en la estructura inorgánica durante el proceso de polimerización, (debido a la proximidad donador-aceptor en el soporte sólido).

Finalmente, en una segunda etapa se pretenden valorar las propiedades del soporte sólido dopado con QDs de CdSe/ZnS sintetizado como material para el desarrollo de un potencial sensor directo para la detección y discriminación de especies volátiles.

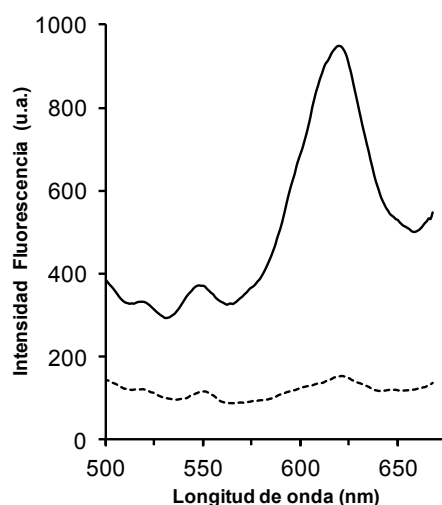
## **D.3.2 Discusión de los resultados**

### **D.3.2.1 Síntesis de sol-geles dopados con QDs.**

Basándonos en estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio<sup>7</sup>, en una primera aproximación se procedió a la síntesis de sol-geles dopados con QDs de CdSe/ZnS (*Ver C.3.1*) simplemente mezclando la disolución coloidal de nanopartículas luminiscentes con la mezcla de silicatos precursores TMOS (*tetrametoxisilano*) y MTMOS (*metiltrimetoxisilano*) en un medio de etanol/agua y NaOH como catalizador del proceso de polimerización (*Ver C.3.10.1*). Se incorporaron junto con la mezcla de precursores las cantidades apropiadas de suspensiones coloidales de QDs sintetizados con anterioridad. Para la síntesis del material sol-gel dopado con QDs se evaluaron diferentes nanopartículas: CdSe/ZnS-TOP/TOPO (*Ver C.3.1*) sin ningún tipo de modificación superficial solubles en cloroformo, CdSe/ZnS-MES (*Ver C.3.3*) y

CdSe/ZnS-P (Ver C.3.4) (todos ellos sintetizados y modificados en nuestro laboratorio). Después del proceso de síntesis del soporte sólido dopado, los sol-gel que contienen los QDs se expusieron durante seis horas a la radiación procedente de una lámpara UV de 4 W (365 nm) para que tuviera lugar la fotoactivación<sup>8</sup> del material. Seguidamente se evaluó el rendimiento de los materiales sol-gel obtenidos en términos de características espectrales, estabilidad de la luminiscencia y homogeneidad.

En primer lugar se observó que, para los QDs sin ningún tipo de modificación superficial CdSe/ZnS-TOP/TOPO (solubles en cloroformo), el material sol-gel dopado con QDs presentaba fluorescencia en el mismo intervalo de emisión que el correspondiente a los QDs dispersados en cloroformo (no se observaba desplazamiento espectral). Sin embargo, la matriz sol-gel resultante era heterogénea y su luminiscencia desaparecía tras la exposición del material a un flujo continuo de agua (C.3.11.1 *Medidas fluorescencia.*). Se observó una rápida lixiviación de las nanopartículas de la matriz sol-gel con la consiguiente pérdida de luminiscencia al poner en contacto el sol-gel dopado con un flujo de agua (Figura 48).

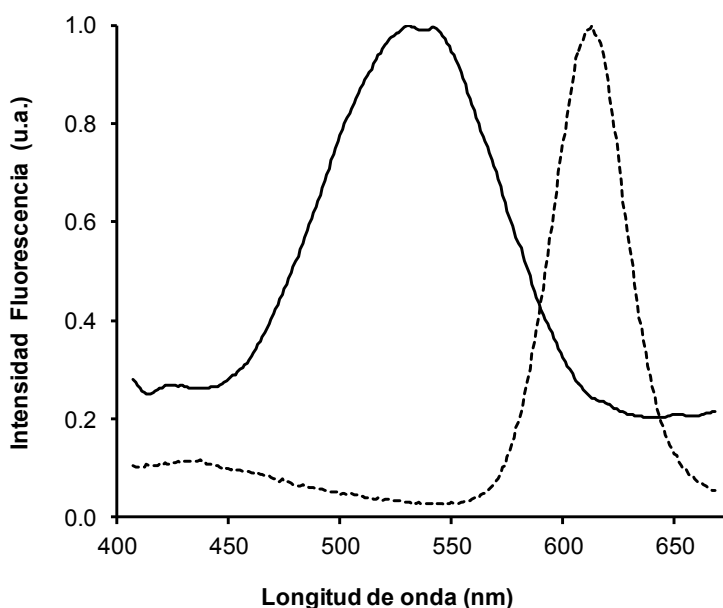


**Figura 48.** Espectro de emisión de los QDs de CdSe/ZnS-TOP/TOPO inmovilizados en el soporte sol-gel antes (línea sólida) y después de haber sido expuestos a un flujo de agua (línea de puntos)  $\lambda_{ex} = 350 \text{ nm}$ .

A continuación se evaluó el material sol-gel dopado con QDs solubles en medio acuoso (cuyo núcleo está protegido por ligandos bifuncionales o por un polímero anfifílico). Las nanopartículas solubles empleadas en primer lugar fueron QDs modificados mediante intercambio de ligandos hidrofóbicos TOP/TOPO (adsorbidos sobre la superficie de los QDs sintetizados originalmente) por moléculas bifuncionales

que poseen un grupo tiol que se une al recubrimiento de ZnS, y en el otro extremo un grupo hidrofílico que proporciona la solubilidad en medio acuoso<sup>9</sup>. Una vez la superficie de los QDs ha sido modificada, las nanopartículas CdSe/ZnS-MAA se dispersan en una disolución reguladora de pH 12, y posteriormente se procede a la preparación del material sol-gel poroso (Ver C.3.10.1). Después de someter al material que contiene a los semiconductores cristalinos a un proceso de fotoactivación, se observó una intensa emisión de luminiscencia. No obstante, se observó la presencia de grandes agregados de nanopartículas en la matriz sólida obtenida (matriz heterogénea), con un amplio ensanchamiento del espectro de emisión de la propia nanopartícula.

Por tanto, el siguiente paso nos condujo al empleo de un recubrimiento con polímero anfifílico como método de solubilización de las nanopartículas en medio acuoso<sup>10</sup>. En esta aproximación las interacciones no específicas entre las colas hidrofóbicas del polímero y los ligandos hidrofóbicos de la superficie del QD son capaces de generar una capa de recubrimiento, el cual proporcionará solubilidad a las nanopartículas en medio acuoso<sup>10</sup>. De esta forma, tras el proceso de síntesis y modificación de la superficie de los QDs de CdSe/ZnS<sup>11,12</sup> (Ver C.3.1 y C.3.4) se prepararon los sol-geles dopados correspondientes y se estudiaron sus características espectroscópicas. El material sol-gel obtenido presentaba un aspecto homogéneo. Sin embargo, se observó un ensanchamiento espectral y un desplazamiento del máximo de la emisión de los QDs hacia longitudes de onda más cortas (desplazamiento hacia el azul) cuando se comparaba dicha emisión con la que presentaban las nanopartículas dispersadas en disolución acuosas antes del proceso de inmovilización (Ver Figura 49).



**Figura 49.** Espectro de emisión de QDs CdSe/ZnS-P en disolución (línea de puntos) e incorporados en el interior de una matriz sol-gel (línea sólida)  $\lambda_{ex} = 350$  nm.

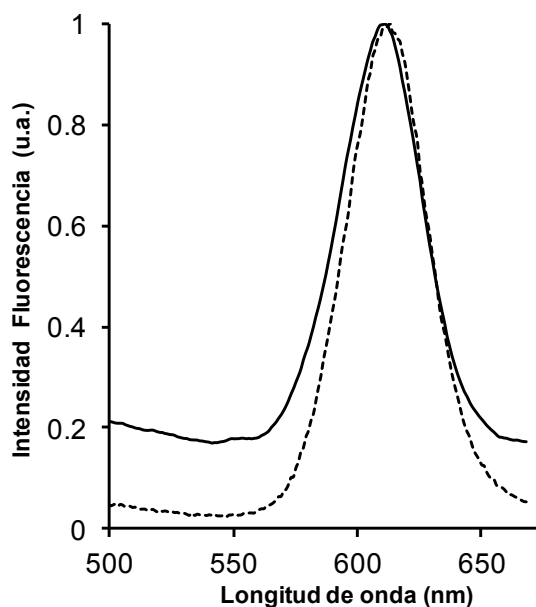
Este desplazamiento hacia longitudes de onda más cortas podría ser atribuido a interacciones de las nanopartículas con los poros de la matriz sólida del sol-gel. Además, el material obtenido presenta una elevada luminiscencia tras el proceso de iluminación continua con la lámpara UV, bien cuando se encontraba únicamente expuesto al aire, o empaquetado en el interior de una celda de flujo bajo la acción de una corriente de agua continua. Desafortunadamente, se observó un decrecimiento significativo de la emisión de fluorescencia con el tiempo de exposición al flujo continuo, lo que se atribuyó a un proceso de lixiviación de los QDs-P desde el soporte sol-gel dopado (probablemente a causa del proceso de solvatación cuando el sol-gel entra en contacto con el agua durante periodos de tiempo relativamente largos se modifica la estructura del material).

Con objeto de superar los inconvenientes derivados de la lixiviación de las nanopartículas de la matriz se decidió evaluar el empleo de nuevos precursores para la síntesis del soporte sólido. En este sentido, el uso de un precursor que posee un grupo funcional amino (*APTES: (3-Aminopropil) trietoxisilano*) podría reducir la lixiviación de los QDs-P, si se establecen enlaces covalentes entre los grupos amino del propio precursor y los grupos carboxílicos del recubrimiento polimérico de las nanopartículas (Ver C.3.10.2) en presencia de un exceso de EDC (*Hidrocloruro de N-(3-dimetilaminopropil)-N-etil-carbodiimida*) como catalizador del enlace entre el grupo

amino del alcóxido y el grupo ácido que aporta el recubrimiento anfílico de la nanopartícula modificada.

Para optimizar la síntesis del material final se prepararon diferentes sol-geles variando las proporciones de los precursores TMOS:APTES desde una relación molar 20:80 hasta una relación 80:20.

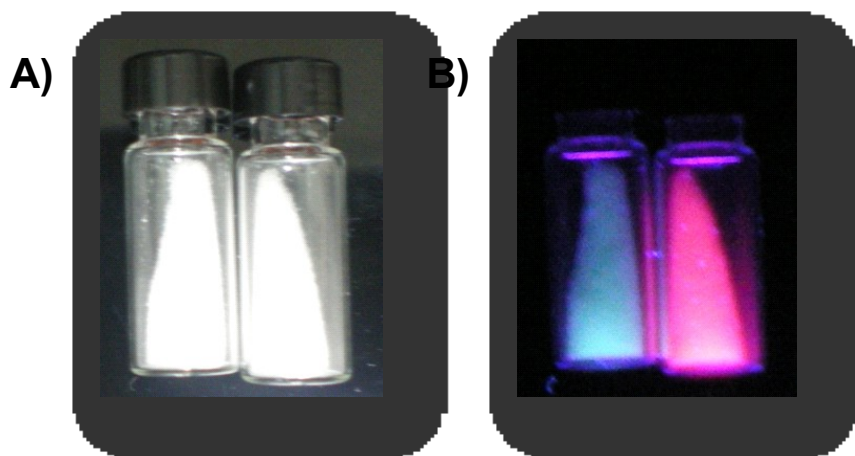
Es importante señalar que en este caso se observó que el orden de adición de los reactivos durante el proceso de preparación de la mezcla precursora es un punto crítico para la obtención de un material homogéneo y con una luminiscencia estable. Así, para obtener sol-geles homogéneos con características ópticas apropiadas los reactivos tienen que incorporarse a la mezcla en el siguiente orden (*Ver C.3.10.2*): EtOH, PQDs, APTES, EDC, TMOS y NaOH bajo un proceso de agitación constante.



**Figura 50.** Espectro de emisión de QDs de CdSe/ZnS-P en disolución acuosa (línea de puntos) e incorporados en el soporte sol-gel mediante el empleo de APTES como precursor (línea sólida)

$$\lambda_{ex} = 350 \text{ nm.}$$





**Figura 51.** *Aspecto final de dos sol-geles dopados con QDs de diferente emisión luminiscente una vez han sido tamizados A) bajo luz natural y B) bajo luz UV.*

En la Figura 50 vemos el espectro de emisión de fluorescencia del material sol-gel preparado con el nuevo precursor aminado *APTES*. El material sol-gel presenta una emisión de luminiscencia intensa sin que por otra parte se observe un incremento de la anchura del pico de emisión o un desplazamiento hacia el azul. Si comparamos el perfil de emisión de las nanopartículas atrapadas en el sol-gel con el perfil de emisión de las mismas nanopartículas en disolución acuosa, observamos cómo no existe una variación de las propiedades ópticas. Además cuando el material obtenido se empaqueta en una celda de flujo y se realizan medidas en continuo bajo una corriente de agua, no se observa una reducción en la intensidad de la señal luminiscente con el tiempo. Por tanto podemos concluir que no tiene lugar un proceso de lixiviación de las nanopartículas desde la matriz sólida.

En conclusión, podemos decir que el proceso desarrollado de la unión covalente de las nanopartículas a uno de los precursores empleados en la síntesis de la matriz sólida parece ser una ruta efectiva para la inmovilización de los QDs en una matriz inorgánica sol-gel sin modificación de las propiedades ópticas del semiconductor nanométrico.

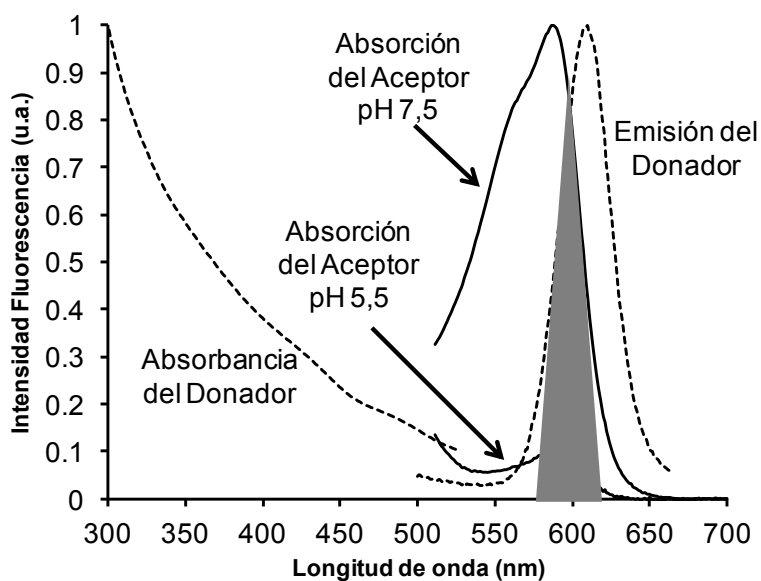
#### **D.3.2.2 Desarrollo de una fase sensora para la medida de pH: co-inmovilización de un indicador de pH con QDs en una matriz sol-gel.**

Tal y como quedó manifiesto a lo largo de la introducción los QDs constituyen un grupo de nanomateriales luminiscentes especialmente apropiados para el desarrollo de sensores químicos basados en procesos FRET<sup>13</sup>. Los procesos FRET implican la

transferencia no radiativa de la energía de excitación desde un fluoróforo excitado como donador, al estado fundamental de un aceptor. Este fenómeno impulsado por interacciones dipolo-dipolo depende no sólo del grado de solapamiento espectral entre la fotoluminiscencia del donador y el espectro de absorción del aceptor, sino también del valor de la sexta potencia de la distancia de separación entre el par donador y aceptor<sup>14</sup>. La emisión de los QDs es simétrica, estrecha y sintonizable. De ahí que su empleo como especie donadora en metodologías FRET es muy apropiada ya que se favorece el solapamiento espectral entre la emisión del donador y la excitación del aceptor<sup>15</sup>.

Hasta la fecha, se han desarrollado sistemas FRET basados en el empleo de los QDs para el estudio de la estructura y dinámica de las macromoléculas<sup>16,17</sup> y para la detección química mediante la medida de cambios en la eficiencia de FRET<sup>18</sup>. A la vista del potencial demostrado por los QDs en el desarrollo de metodologías FRET, y con objeto de dar un paso más hacia el desarrollo de materiales sensores basados en QDs, se hace necesario asegurar la inmovilización de dichas nanopartículas en un soporte sólido apropiado para fabricar fases sólidas activas<sup>2</sup>. En este sentido, la tecnología sol-gel ofrece una buena alternativa<sup>5</sup>, y ya se ha comenzado a utilizar para la incorporación de nanocristales semiconductores coloidales en una matriz estructurada<sup>3,19</sup>.

En este contexto, una vez alcanzado el éxito en el proceso de síntesis de sol-geles dopados con QDs asegurando unas propiedades físicas y ópticas estables, el siguiente paso fue intentar conseguir la co-inmovilización de un aceptor junto con los QDs en el interior del soporte sólido. El objetivo final consiste en lograr desarrollar un sensor basado en un mecanismo de fluorescencia con transferencia de energía (FRET) (Ver C.3.10.3). Como aceptor "*modelo*" se seleccionó un colorante sensible a variaciones de pH, el BCP (BromoCresol Purple) cuyo espectro de absorción se modifica en el intervalo de pH<sup>20</sup> entre 5,2 y 7,8. Como observa en la Figura 52, el espectro de absorbancia del colorante (entre 500 y 650 nm) disminuye la intensidad de absorción cuando el pH del medio se reduce desde 7,5 hasta 5,5.

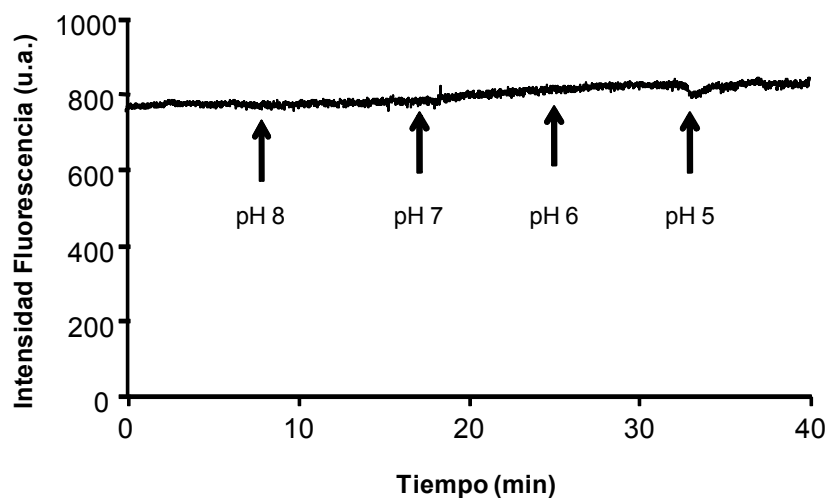


**Figura 52.** Solapamiento espectral entre el espectro de emisión de los QDs y el espectro de absorción de un aceptor (colorante) a dos valores de pH.

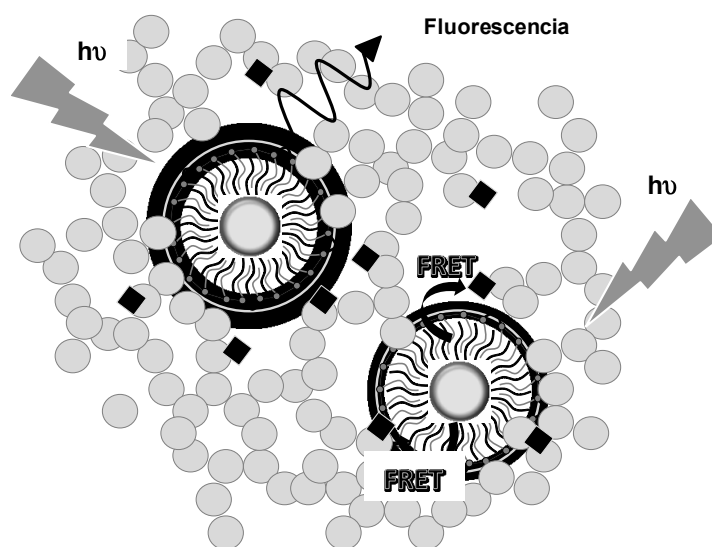
Con objeto de asegurar un alto grado de solapamiento, necesario para alcanzar una alta eficiencia en el proceso de FRET, se han sintetizado unos QDs que presentan una emisión luminiscente en la región donde varía la absorbancia del colorante seleccionado (aceptor). Como se observa en la *Figura 52* se puede alcanzar un buen solapamiento espectral entre el espectro de emisión de los QDs (donador) y el espectro de absorbancia de nuestro colorante (aceptor) en la región comprendida entre 500 y 650 nm. Por ello, para desarrollar la nueva fase sensora sol-gel conteniendo el donador y el aceptor co-inmovilizados, se emplearon QDs de CdSe/ZnS-P (donador) con una emisión luminiscente centrada en torno a los 600 nm, y el BCP como aceptor. Ambos reactivos se incorporaron dentro de la fase acuosa de la mezcla precursora del sol-gel (*Ver C.3.10.3*) para permitir su inmovilización de forma conjunta en la matriz sol-gel y obtener así la nueva fase sensora dopada con ambos materiales donador y aceptor.

Previamente a la síntesis de la fase sensora se había comprobado experimentalmente que la luminiscencia de los QDs atrapados dentro de la estructura sol-gel no estaba afectada por variaciones del pH del medio. Para ello una fracción de la matriz sólida dopada únicamente con QDs se empaquetó en una celda de flujo registrándose la respuesta de la señal luminiscente de los QDs cuando se variaba el pH de la disolución portadora que circulaba a través de la celda. A la vista de los resultados recogidos en la *Figura 53* podemos concluir que cualquier cambio que se observe en la señal luminiscente procedente de los QDs atrapados en el interior de la

matriz sólida junto con el aceptor (*BCP*) puede ser atribuido al proceso de transferencia de energía entre donador y aceptor, y no a la influencia del pH del medio sobre la luminiscencia del donador.



**Figura 53.** Efecto de variaciones de pH del medio sobre la intensidad de emisión luminiscente procedente de QDs CdSe/ZnS-P atrapados en el interior de la estructura sol-gel.

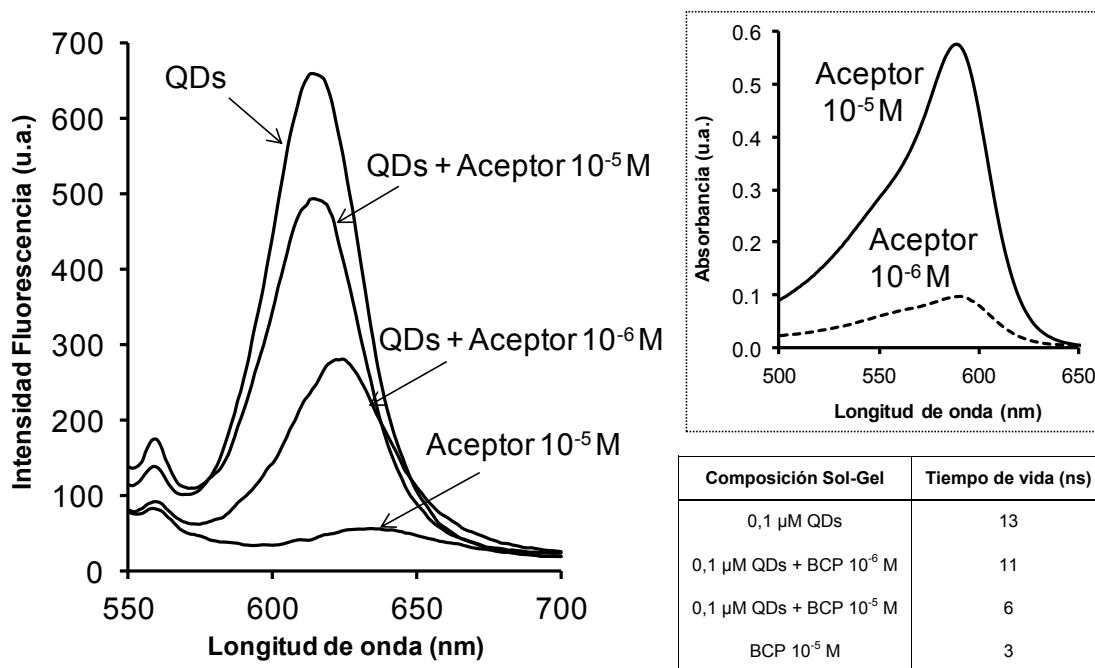


**Figura 54.** Esquema del funcionamiento de la fase sensora sol-gel que posee en su interior co-inmovilizados QDs (donador) y BCP (aceptor).

Como las cantidades de precursores APTES y TMOS a emplear habían sido optimizadas previamente, en este caso las variables a optimizar fueron las concentraciones tanto de aceptor como donador en la mezcla precursora (C.3.10.3). Se llevó a cabo la síntesis de numerosos materiales sol-gel dopados con el donador (QDs) y el aceptor (BCP) de forma conjunta. En la Figura 55 se registra la reducción en la

intensidad de la fluorescencia de los QDs actuando como donadores a medida que se incrementa la concentración del aceptor co-inmovilizado en el soporte sólido. Las eficiencias de FRET oscilan entre el 0,26 y 0,65 cuando las concentraciones del aceptor BCP varían entre  $10^{-6}$  M y  $10^{-5}$  M, respectivamente.

Se llevaron a cabo experimentos adicionales haciendo uso de medidas de tiempo resuelto, los cuales apoyaron las conclusiones obtenidas anteriormente: la transferencia de energía en procesos de FRET se presenta como un decrecimiento en la intensidad de fluorescencia del donador y una reducción del tiempo de vida del excitón<sup>21</sup>. Haciendo uso de un laser de excitación de picosegundos a 405 nm (anchura de pico de 900 ps con una velocidad de repetición de 100 KHz), se midió el decaimiento de la fluorescencia de los QDs (donadores) atrapados en el sol-gel junto con el colorante sensible al pH del medio (aceptor). Los tiempos de decaimiento de los QDs-P inmovilizados con una concentración de colorante de  $10^{-5}$  M son del orden de 6 ns. En el caso de una concentración diez veces inferior de colorante ( $10^{-6}$  M) además del decrecimiento en la medida de eficiencia de FRET, observamos un incremento en los tiempos de decaimiento medidos (11 ns). Como cabe esperar, el proceso FRET ofrece un camino alternativo para la relajación del donador, reduciéndose así su tiempo de vida a medida a medida que se incrementa la concentración del colorante. Esta observación está en concordancia con los espectros de emisión fluorescente normalizados de estos soportes sólidos que se pueden ver en la Figura 55: el pico de emisión del donador es mucho más reducido cuando la concentración del aceptor (colorante) se incrementa desde  $10^{-6}$  M a  $10^{-5}$  M.



**Figura 55.** Efecto de concentraciones crecientes del aceptor (BCP) añadidos a la mezcla de precursores poliméricos sobre la emisión de luminiscencia del sol-gel dopado con QDs resultante. En la parte superior derecha se muestra la variación del espectro de absorbancia para diferentes concentraciones del aceptor. La tabla en la parte inferior derecha recoge los valores de tiempos de vida para sol-gel dopados con distintas cantidades de donador (QDs) y aceptor (BCP).

Los estudios llevados a cabo permitieron desarrollar un procedimiento sencillo y general para lograr la co-inmovilización del donador y aceptor en el interior de la matriz sol-gel. De esta forma fue posible asegurar un proceso de transferencia de energía de forma altamente eficiente.

### D.3.2.3 Optimización de la concentración de donador y aceptor co-inmovilizados.

Con objeto de desarrollar una fase sensora sensible a cambios en el pH se procedió a la optimización de las concentraciones de donador (QDs) y de aceptor (colorante sensible al pH) utilizadas en la preparación de la mezcla precursora de la matriz sólida. La concentración de donador empleada en la mezcla se optimizó a través de la síntesis de varios materiales sol-gel en los que se modificaba la concentración de nanopartículas en la mezcla desde  $0,01 \mu\text{M}$  a  $1 \mu\text{M}$  (a lo largo de estos experimentos no se utilizó el colorante, se buscaba obtener una señal de luminiscencia intensa). Se evaluó la respuesta de distintas fases sensoras así preparadas frente al pH empaquetando el material dentro de una celda de flujo (C.3.11.1) y registrando la señal

de emisión luminiscente obtenida mientras se pasaba a través de la celda de flujo una disolución acuosa de un pH concreto.

Tras llevar a cabo las medidas de intensidad de fluorescencia de los QDs inmovilizados en todas las matrices obtenidas en función de los distintos pHs, se seleccionó una concentración de QDs de 0,1  $\mu\text{M}$  (para esta concentración se obtiene una señal de fluorescencia estable y analíticamente útil en las condiciones instrumentales y experimentales utilizadas).

A continuación, de forma similar se procedió a la optimización de la concentración de aceptor en la mezcla precursora de la matriz sol-gel. Se sintetizaron distintos materiales sol-gel variando la concentración del aceptor y asegurando una concentración de QDs CdSe/ZnS-P en la mezcla de precursores de 0,1  $\mu\text{M}$ . Los valores de las intensidades de fluorescencia y las eficiencias de FRET obtenidos para varios de los sol-geles sintetizados con QDs y BCP conjuntamente se recogen en la *Tabla 4*.

**Tabla 4.** Efecto de concentraciones crecientes de aceptor (BCP) sobre la luminiscencia del donador (QDs) y sobre la eficiencia de FRET co-inmovilizados en la matriz.

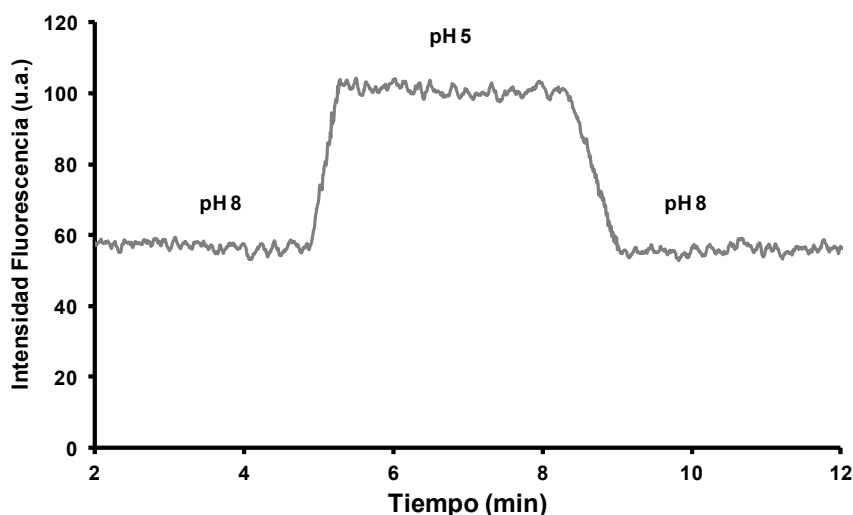
[BCP] (mol/L)	Intensidad de Fluorescencia (u.a.)	Eficiencia de FRET
0	653	0
$10^{-7}$	579	0,11
$10^{-6}$	485	0,26
$10^{-5}$	231	0,65
$10^{-4}$	40	0,94

A partir de los datos recogidos en la tabla anterior, se seleccionó una concentración final de aceptor de  $10^{-5}$  M BCP. Vemos como para concentraciones inferiores de aceptor se obtienen unos valores inferiores de eficiencia de FRET, y por tanto una escasa sensibilidad. En cambio para concentraciones elevadas de BCP se obtienen valores de eficiencia de FRET superiores, pero no muy apropiados para la detección de variaciones en el pH a través de medidas de fluorescencia. Las

condiciones finalmente seleccionadas para la síntesis del material sol-gel fueron  $10^{-5}$  M de BCP y  $0,1 \mu\text{M}$  de QDs CdSe/ZnS-P.

#### **D.3.2.4 Evaluación de la fase sensora para medidas de pH basadas en un proceso de FRET.**

Tras las síntesis del material sol-gel dopado con las concentraciones óptimas de donador y aceptor, la matriz sol-gel resultante se puso en contacto por medio de una celda de flujo conectada con un sistema en flujo (*Figura 22*) a disoluciones acuosas con diferente pH. Se registró la evolución de la intensidad de la señal luminiscente cuando se utilizaban como disoluciones portadoras reguladoras con valores de pH extremos, el límite superior e inferior para los cuales el BCP varía su espectro de absorbancia. Se observa un incremento de la señal luminiscente de los QDs (*Figura 56*) como consecuencia del proceso de FRET (un claro decrecimiento de la intensidad en el espectro de absorción del aceptor tiene lugar a pH ácidos).



**Figura 56.** *Decrecimiento de la emisión de luminiscencia del donador (QDs) a medida que el pH se incrementa.*

Las medidas de emisión luminiscente registradas muestran, como en el caso de muestras acuosas de pH bajos (ácidos) tiene lugar un incremento de la luminiscencia de los QDs atrapados dentro del material sol-gel. Por otra lado, la eficiencia de FRET muestra también un comportamiento dependiente del valor del pH del medio (*Tabla 5*).



**Tabla 5.** Efecto de las variaciones de pH de las muestras sobre las intensidades de luminiscencia y sobre las eficiencias de FRET medidas cuando se emplea como fase sensora una matriz sol-gel sintetizada co-inmovilizando los QDs-P con el aceptor (BCP).

pH	Intensidad de Fluorescencia (u.a.)	Eficiencia de FRET
5	105	0,70
6	81	0,76
6,5	62	0,82
8	55	0,85

En resumen, se ha propuesto un procedimiento sencillo y general para llevar a cabo la inmovilización de los QDs de CdSe/ZnS-P (actuando como donadores del proceso) conjuntamente con un colorante apropiado como aceptor en la estructura de un sol-gel inorgánico. A través del procedimiento propuesto, las características luminiscentes de las nanopartículas atrapadas dentro de la matriz inorgánica permanecen inalteradas, y presentan una elevada estabilidad y robustez. Además, nuestros estudios indican que la co-inmovilización de un colorante junto con los QDs dentro de la estructura sol-gel puede proporcionar un nuevo, sencillo y ventajoso enfoque para el futuro desarrollo de sensores basados en la metodología sol-gel y en el proceso de FRET.

#### **D.3.2.5 Desarrollo de un fase sensora para la detección directa de especies volátiles: sol-gel dopado con QDs.**

Estudios fundamentales revelan que las propiedades luminiscentes de los QDs dependen en gran medida del estado de su superficie<sup>22</sup>. Por ello, las interacciones físicas o químicas entre una determinada especie (analito) con la superficie de la nanopartícula podrían provocar cambios sobre las cargas superficiales del QD, lo que finalmente influirá en la fotoluminiscencia de los mismos. Este efecto se puede emplear como base para el desarrollo de tecnologías de detección para “especies reactivas”<sup>2</sup>. De forma mayoritaria se han observado variaciones de la luminiscencia de dispersiones coloidales de QDs por la presencia de determinados iones (p. ej.: Ag<sup>+</sup>, CN<sup>-</sup>, Cu<sup>2+</sup>) en

disolución. Los métodos desarrollados basándose en esta interacción directa del analito con el QD son generalmente sencillos, aunque por otra parte se suele desconocer el mecanismo exacto por el cual se presentan las respuestas específicas para el analito.

Haciendo uso de nanocristales de CdSe incrustados en films poliméricos Nazzal y col. los emplearon como potenciales sensores de gases<sup>23</sup>, utilizando como señal analítica las variaciones de la fotoluminiscencia de los QDs (recubiertos con un monocapa de ligandos orgánicos), ocasionadas por las interacciones con distintas aminas gaseosas. Esta vía puede abrir el paso hacia el desarrollo de nuevos sensores basados en el empleo de los QDs como los propios indicadores luminiscentes. Más recientemente Potyrailo y col. evaluaron la respuesta luminiscente procedente de nanopartículas de CdSe de distinto tamaño incorporadas en un film polimérico a la exposición de vapores polares y no polares<sup>24</sup>. Los nanocristales de diferente tamaño incorporados en el interior del film proporcionaron un patrón de respuesta luminiscente individual cuando el sensor era expuesto a metanol y tolueno. Se postuló que las diferencias observadas en los patrones de respuesta se pueden atribuir a un efecto combinado de la variación de tamaño, en el medio dieléctrico que rodea la nanopartícula, y un posible proceso de oxidación<sup>24</sup>.

El desarrollo de sensores químicos directos con capacidades avanzadas de reconocimiento que permitan la detección e identificación de determinados contaminantes medioambientales de forma rápida es una necesidad actual. En particular la detección de algunas especies tóxicas que poseen una baja presión de vapor como p. ej. los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) en determinados ambientes de trabajo es de interés, puesto que estos compuestos pueden provocar problemas en el hígado o en el sistema nervioso, o incluso incrementar el riesgo de padecer cáncer<sup>25</sup>. De hecho existe una demanda apremiante para desarrollar sensores químicos capaces de responder de forma selectiva, rápida, fiable, y reproducible a la presencia de dichos VOCs.

En este contexto, una vez se ha desarrollado y caracterizado el material sol-gel inicial dopado únicamente con QDs a partir de los precursores TMOS y APTES, y demostrada ya su aplicabilidad como plataforma para el desarrollo de sensores indirectos basados en un mecanismo de transferencia de energía, se procedió a realizar una caracterización complementaria de dicho material para su empleo en la detección y discriminación de diferentes compuestos orgánicos volátiles (VOCs).

Se utilizaron nuevamente QDs de CdSe/ZnS-P como fluoróforo atrapado en el interior de la matriz sólida. En primer lugar, se comprobó como tenía lugar una disminución rápida (*quenching*) y reversible de la fluorescencia de los QDs inmovilizados cuando estos eran expuestos a distintos vapores orgánicos. Asimismo, se observó que el proceso de reducción de la fluorescencia dependía tanto del tipo de gas o vapor orgánico con el que se ponía en contacto la muestra como de su propia concentración. Experimentalmente se comprobó también como la respuesta de la matriz sol-gel dopada a la presencia del gas era dependiente de la porosidad de la misma, por tanto de su composición.

### D.3.2.5.1 Sol-geles dopados.

En base a estudios preliminares, se prepararon varios sol-geles dopados con QDs con diferentes porcentajes de los silicatos precursores, a partir de los que se seleccionaron finalmente dos materiales activos diferentes:

1) En el caso del material **A** la proporción de los compuestos TMOS:APTES fue de 50:50 en la mezcla de silicatos precursores. El procedimiento seguido para la síntesis se basa en el protocolo C.3.10.2 recogido en la parte experimental de la memoria, con pequeñas modificaciones en las cantidades de reactivos. Se utilizaron 2,5 mL de etanol, 0,5 mL de QDs CdSe/ZnS-P y 3,0 mL de agua destilada para la mezcla inicial. Tras la agitación de dicha mezcla durante cinco minutos se añaden de forma consecutiva 750  $\mu\text{L}$  de APTES, 20  $\mu\text{L}$  de EDC 0,05 M, 750  $\mu\text{L}$  TMOS y 50  $\mu\text{L}$  de hidróxido de sodio 0,1 M. El xerogel poroso finalmente obtenido fue molido y tamizado, seleccionándose los fragmentos sólidos de entre 80  $\mu\text{m}$  y 200  $\mu\text{m}$ .

2) En el caso de la síntesis del segundo material (**B**) se siguió el mismo procedimiento, pero modificando las cantidades de precursores usados: APTES (1120  $\mu\text{L}$ ) y de TMOS (380  $\mu\text{L}$ ) (TMOS:APTES 25:75).

Las diferencias en el proceso de síntesis dan como resultado materiales con diferente porosidad, es decir, los mismos QDs están atrapados dentro de entornos distintos. Esa diferencia en porosidad justifica, como veremos más adelante, el diferente grado de interacción analito-QD en los distintos sol-geles. Los sol-geles dopados con QDs fragmentados fueron empaquetados directamente en una celda de flujo (*Ver Figura 21C*) para realizar las medidas de emisión luminiscente en presencia de los distintos compuestos orgánicos (las medidas fueron realizadas a temperatura ambiente y presión atmosférica). Tras la síntesis de los materiales dopados con QDs fue

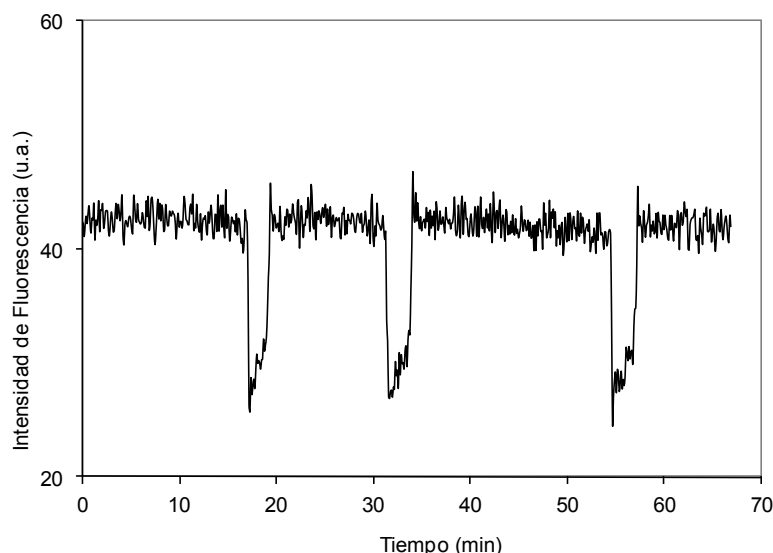
necesaria una etapa de fotoactivación previa antes de proceder a su uso. Así, los sol-geles dopados con QDs se expusieron a la acción de luz UV de 350 nm durante al menos dos horas antes de su uso (hasta que se alcanza una emisión luminiscente estable a 602 nm).

#### D.3.2.5.2 Sistema experimental.

Para evaluar los efectos de la exposición a distintos vapores orgánicos sobre la luminiscencia de las nanopartículas atrapadas en el interior del sol-gel, se utilizó un sistema de flujo para gases convencional (Figura 23). A lo largo del estudio se utilizaron como analitos modelo: *etanol*, *metanol*, *cloroformo* y *acetona*. Todos ellos son ejemplos de analitos orgánicos volátiles de interés, cuya presencia en determinados entornos debería ser controlada como p. ej. ambientes de trabajo, laboratorios, instalaciones médicas y en la industria alimentaria. La señal de fluorescencia procedente de los sol-geles dopados y empaquetados en el interior la celda de flujo se registró de forma continua<sup>26,27</sup> en el fluorímetro.

Empleando un diluidor exponencial con llave de tres vías se introducen los vapores gaseosos en el sistema de flujo para gases. El diluidor permite hacer que el gas portador (Argón) llegue directamente a nuestro sensor, o bien permite desviar el flujo de gas portador para que circule por el interior de dicho matraz y de esta forma arrastre a la muestra (VOCs inyectados directamente en el diluidor exponencial) hacia la fase sensora<sup>7</sup>. El flujo del gas portador se controla y mantiene constante durante todo el proceso por medio de un rotámetro.

Cada compuesto se inyectó en el interior del diluidor exponencial a tres niveles distintos de concentración. Los estudios también se llevaron a cabo a lo largo de días diferentes. Los patrones de respuesta para cada compuesto se elaboraron a partir del registro de las intensidades de luminiscencia de la fase sensora antes, durante y después de la exposición al compuesto orgánico volátil.



**Figura 57.** Respuesta fluorescente de la fase sensora A a repetidas exposiciones a 6,52 mmoles de etanol.

Los estudios experimentales muestran que ni el perfil ni la posición de la emisión luminiscente varía por la exposición a los compuestos orgánicos volátiles modelo, aunque si se observó que la interacción de los analitos con QDs atrapados en la matriz sol-gel provoca cambios muy significativos sobre la intensidad de emisión luminiscente de las nanopartículas inmovilizadas. Se registró una disminución de la intensidad de fluorescencia de los QDs tras la interacción con los compuestos orgánicos volátiles inyectados en el sistema de flujo, si bien dicho proceso es reversible en el caso de todos los analitos objetos de estudio.

En la Figura 57 se muestra el efecto de tres inyecciones consecutivas de vapor de etanol sobre la emisión de fluorescencia de los QDs atrapados en el interior de la matriz sol-gel dopada con QDs (*fase sensora A*). Se puede ver como la intensidad luminiscente decrece de forma reversible bajo la exposición a concentraciones creciente.

Se encontró una relación lineal entre el área de pico de la fluorescencia y la cantidad de analito inyectada en el sistema de flujo, (coeficientes de regresión lineal del orden de 0,999). La cinética de recuperación de la fotoluminiscencia de los QDs inmovilizados en la matriz sólida frente a la presencia de compuestos orgánicos volátiles fue relativamente rápida (inferior a 3,5 min para concentraciones de analito bajas y alrededor de 13 min para concentraciones más elevadas). Además, las señales obtenidas tras la exposición de ambas fases sensoras (A y B) a los compuestos volátiles

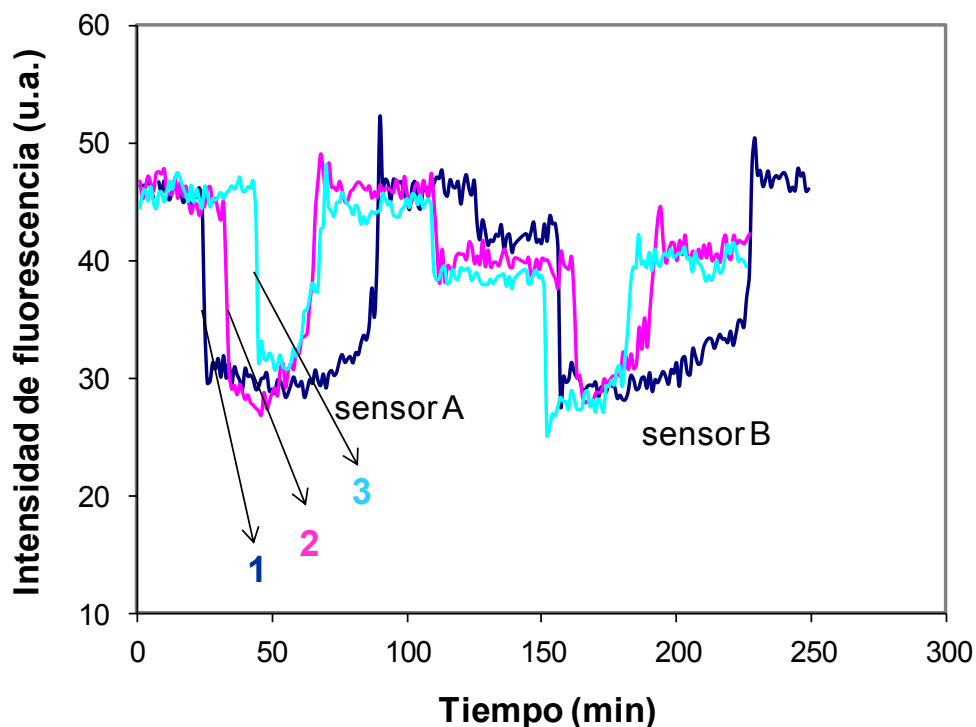
bajo estudio fueron altamente reproducibles, con desviaciones estándar relativas entre el 1-4% (dependiendo del analito y su concentración). Los límites de detección calculados se estimaron de acuerdo con el criterio de la IUPAC: bajo las condiciones experimentales optimizadas fue posible detectar valores del orden de 1 mmol para cada uno de los analitos inyectados en el diluidor exponencial.

#### D.3.2.5.3 Mecanismo de respuesta.

La posible explicación para el efecto de quenching observado puede ser resultado de un cambio reversible del entorno dieléctrico del sol-gel. Dicha modificación del entorno influirá sobre las propiedades optoelectrónicas de los QDs atrapados en el sol-gel<sup>24</sup>, así como sobre la integridad física del material sensor y sus propiedades tras ser expuesto a la acción de los compuestos orgánicos volátiles<sup>28</sup>. Las diferencias observadas en el grado de modificación de la intensidad de luminiscencia se pueden atribuir a la diferente naturaleza de los propios analitos.

Por otro lado, la naturaleza de la matriz en la cual se inmovilizan las nanopartículas también puede contribuir a la variaciones de los patrones de respuesta, como se puede observar en la Figura 58. Si el mismo tipo de QDs (CdSe/ZnS-P) son inmovilizados en el interior de sol-geles de diferente composición (fase sensora A y B), cada material presenta un patrón de respuesta fotoluminiscente reversible diferente por exposición a vapores orgánicos de elevada y reducida polaridad. Ambas fases sensoras (A y B) muestran respuestas con amplitudes distintas y/o ventanas de tiempo de respuesta para cada analito ensayado.

Las diferencias observadas en las características de las respuestas luminiscentes de los QDs atrapados en el material A y B se pueden relacionar no únicamente con el cambio en el entorno dieléctrico que rodea al nanocrystal, sino también con cambios en la porosidad de la matriz polimérica sol-gel (debido a diferencias en la composición de la matriz precursora). Esto podría condicionar la accesibilidad de los analitos gaseosos a los QDs atrapados y, por tanto, podría crear regiones de detección únicas que interaccionen de diferente manera con las moléculas orgánicas gaseosas.



**Figura 58.** Respuesta de la fluorescencia del sensor A y el sensor B a 23,2 mmol de (1) etanol, (2) metanol y (3) acetona.

#### D.3.2.6 Dynamic Pattern Recognition

Como ya hemos mencionado, los modelos de respuesta temporal se generaron a partir de la medida de señales de emisión luminiscente de los QDs inmovilizados en las dos fases sensoras (A y B) expuestas a diferentes concentraciones de los analitos bajo estudio. Bajo las condiciones experimentales seleccionadas la aplicación de un algoritmo sencillo, basado en la identificación del disolvente gaseoso por medio del patrón de respuesta, puede ser suficiente para identificar y distinguir entre los cuatro analitos empleados en el estudio. Análisis de datos de este tipo ya se han propuesto en el caso de sistemas de detección basados en el empleo de polímeros que poseen nanomateriales inmovilizados en su interior<sup>29,30</sup>.

Se decidió recurrir al empleo de herramientas quimiométricas y particularmente del análisis de componentes principales PCA (Principal Component Analysis)<sup>31,32</sup> con objeto de intentar establecer la capacidad de la fase sensora (sol-gel dopado con QDs CdSe/ZnS-P) para discriminar entre los distintos compuestos gaseosos en una mezcla dada.

PCA es un método estadístico empleado en el análisis de datos<sup>32</sup> multivariante. Se analizaron los datos de intensidad de emisión luminiscente obtenidos del análisis de la respuesta dinámica de las fases sensoras desarrolladas durante exposiciones repetidas a distintas cantidades de vapores de metanol, etanol, cloroformo y acetona de forma aislada o en mezclas.

El análisis de componentes principales tiene el siguiente objetivo: dadas “ $n$ ” observaciones de “ $p$ ” variables, se analiza si es posible representar adecuadamente esta información con un número menor de variables construidas como combinaciones lineales de las originales. Su utilidad es doble:

1) Permite representar óptimamente en un espacio de dimensión pequeña observaciones de un espacio general  $p$ -dimensional. En este sentido, componentes principales es el primer paso para identificar las posibles variables latentes, o no observadas que generan datos.

2) Permite transformar las variables originales, en general correladas, en nuevas variables incorreladas, facilitando la interpretación de los datos.

Precisamente este segundo aspecto es el que pretendemos explotar, utilizando la técnica de PCA<sup>33</sup>, para analizar los resultados de las medidas de intensidad luminiscente registradas tras la exposición de las fases sensoras sol-gel desarrolladas a distintos niveles de los diferentes analitos volátiles bajo estudio.

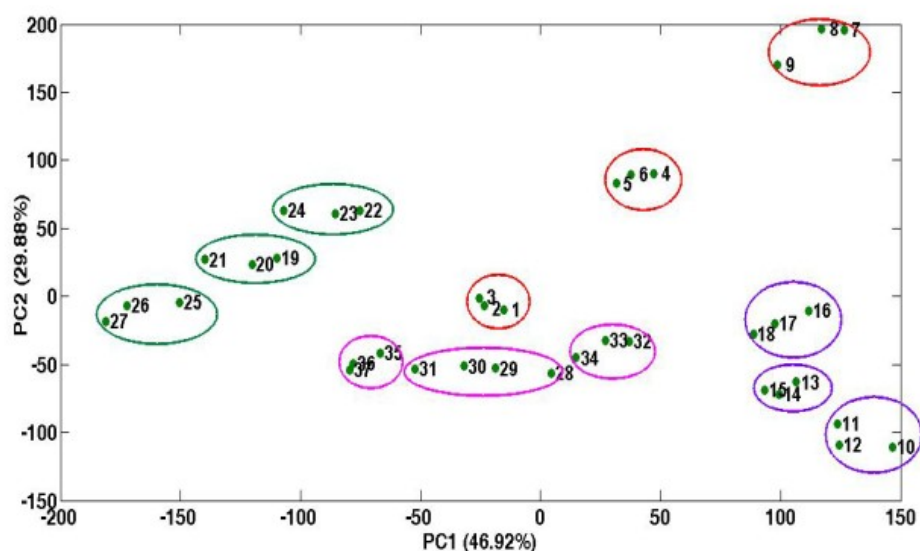
Para ello, las dos fases sensoras desarrolladas, A y B, se empaquetaron en la celda de flujo de fluorescencia a través de la cual se hizo pasar la corriente gaseosa que transporta las especies volátiles de interés a 3 niveles de concentración del analito diferentes. Cada exposición de cada una de las fases sensoras a cada uno de los analitos volátiles bajo estudio fue repetida tres veces, y se monitorizó la señal de emisión luminiscente de la fase sensora empaquetada en la celda de flujo. Por tanto, se registraron 36 respuestas o variaciones de la fluorescencia con el tiempo para todos los analitos con cada sensor (el número total final exposiciones fue de 72). Es decir, puesto que se expusieron los dos materiales sensores (A y B) a cada analito y nivel de concentración se recogieron un total de 144 puntos para cada muestra. La aportación de datos para PCA se puede representar por medio de una matriz (280x37). Los cálculos de PCA utilizan un algoritmo de descomposición y fueron realizados con MATLAB 7.0. El análisis de los resultados por PCA indica que la mayoría de la información (hasta un 84%) fue proporcionada por PC1, PC2 y PC3.



La Figura 59 ilustra las puntuaciones de las dos primeras componentes principales para los datos de las señales de emisión fluorescente. La presentación de los resultados en este formato facilita una visión clara de las tendencias de los diferentes componentes entre sí, permiten establecer límites distintos entre grupos y se utilizan para la clasificación de los datos en grupos. Las muestras dentro del mismo sub-grupo se agrupan juntas en la misma área de la representación del PCA. Las muestras que poseen números divergentes se localizan más separadas.

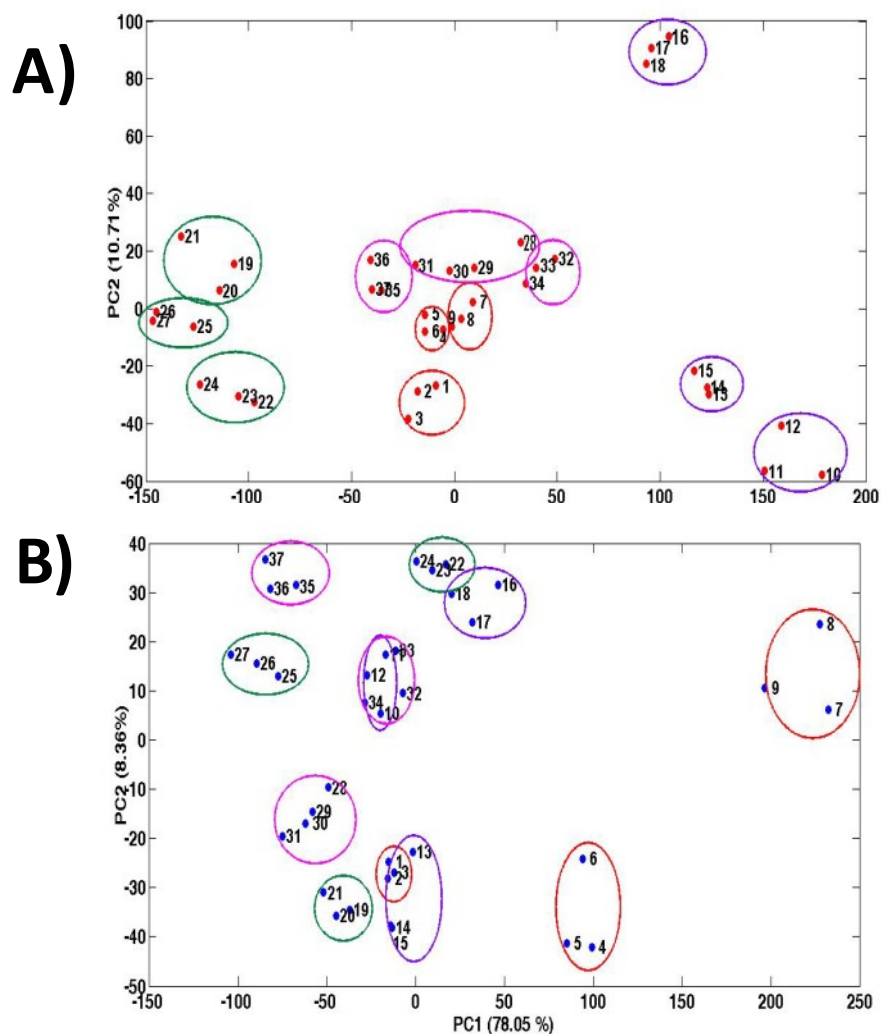
A partir de la Figura 59, se observa claramente que las respuestas de los sensores a los distintos vapores están bien diferenciadas en el espacio PCA (p. ej. datos de cada muestra agrupados en regiones diferentes independientemente de su concentración).

De esta forma, podemos concluir que es posible en una muestra gaseosa la discriminación entre metanol, etanol, cloroformo y acetona. Se evaluó la capacidad de discriminación para uno de estos sensores utilizando únicamente la intensidad de las señales a partir de una matriz de datos de (140x37). Cuando los datos se analizaron por PCA, se logró una buena discriminación entre los cuatro analitos como se puede observar en la Figura 60 A y B. A partir de las Figura 59 y Figura 60, el análisis de datos utilizando las señales de los dos sensores (A y B) proporciona una mejor capacidad de discriminación debido a perfil de respuesta más diferenciado para cada analito.



**Figura 59.** Resultados del análisis por PCA del sensor A y B. Los puntos en el interior de los círculos representan la respuesta dinámica a repetidas exposiciones de los vapores al sensor. (1-3) 23, 26 mmol Etanol, (4-6) 14,34 mmol Etanol, (7-9) 6,52 mmol Etanol; (10-12) 38,12 mmol Metanol, (13-15) 23,43 mmol Metanol, (16-18) 14,34 mmol Metanol; (19-21) 38,02 mmol

Cloroformo, (22-24) 23,20 mmol Cloroformo, (25-27) 14,32 mmol Cloroformo (28-31) 23,10 mmol Acetona, (32-34) 14,31 mmol Acetona, (35-37) 10,86 mmol Acetona.



**Figura 60.** Resultados del análisis por PCA de (A) la respuesta del sensor A y (B) de la respuesta del sensor B. Los puntos dentro de cada círculo representan la respuesta dinámica a partir de la exposición del sensor a los vapores. (1-3) 23,26 mmol Etanol, (4-6) 14,34 mmol Etanol, (7-9) 6,52 mmol Etanol; (10-12) 38,12 mmol Metanol, (13-15) 23,43 mmol Metanol, (16-18) 14,34 mmol Metanol; (19-21) 38,02 mmol Cloroformo, (22-24) 23,20 mmol Cloroformo, (25-27) 14,32 mmol Cloroformo (28-31) 23,10 mmol Acetona, (32-34) 14,31 mmol Acetona, (35-37) 10,86 mmol Acetona.

En resumen podemos concluir que los QDs de CdSe/ZnS-P atrapados en una matriz sol-gel demuestran ser un material sensor sencillo, fiable y reproducible para la detección e identificación de vapores orgánicos. Por medio de las variaciones

apropiadas en la composición de la matriz, el método desarrollado presenta una selectividad parcial por la exposición a varios compuestos volátiles. Gracias al empleo de técnicas quimiométricas y de reconocimiento de pautas empleadas para procesar las señales de emisión procedentes de las fases sensoras tras su exposición a las muestras gaseosas se puede conseguir la identificación individual y discriminación. Este trabajo representa un primer paso en el desarrollo de una nueva vía para el análisis directo de compuestos orgánicos volátiles en atmosferas contaminadas. Los resultados obtenidos se muestran prometedores para el futuro desarrollo de sensores luminiscentes sensibles y selectivos basados en el empleo de QD para la detección de alcoholes u otros compuestos orgánicos volátiles importantes. Sería preciso realizar estudios adicionales en el caso de que se quiera profundizar en el mecanismo en que se basa la detección de las especies, la relación entre la composición y la microestructura del sensor, y su rendimiento de detección y propiedades. También se deben buscar nuevas vías para mejorar la selectividad de la detección de dicho materiales basados en QDs.

### D.3.3 Referencias

- <sup>1</sup> P. Jorge, M. A. Martins, T. Trindade, J. L. Santos, F. Farahi, **Optical fiber sensing using Quantum Dots**. *Sensors*, 2007, 7, 3489-3534.
- <sup>2</sup> J. M. Costa-Fernández, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, **The use of luminescent quantum dots for optical sensing**. *Trends in Analytical Chemistry*, 2006, 25, 3, 207-218.
- <sup>3</sup> R. Reisfeld, T. Saraidarov, **Innovative materials based on sol-gel technology**. *Optical Materials*, 2006, 28, 64-70.
- <sup>4</sup> O. Lev, M. Tsionsky, L. Rabinovich, V. Glezer, S. Sampath, I. Pankratov, J. Gun, **Organically modified sol-gel sensors**. *Analytical Chemistry*, 1995, 67, 22A-30A.
- <sup>5</sup> V. B. Kandimalla, V. S. Tripathi, H. X. Ju, **Immobilization of biomolecules in sol-gels: biological and analytical applications**. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 2006, 36, 73-106.
- <sup>6</sup> M. Guglielmi, A. Martucci, E. Menegazzo, G. C. Righini, S. Pelli, J. Fick, G. Vitrant, **Control of semiconductor particle size in sol-gel thin films**. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 1997, 8, 1017-1021.
- <sup>7</sup> J. M. Costa-Fernández, M. E. Díaz-García, A. Sanz-Medel, **Sol-gel immobilized room-temperature phosphorescent metal-chelate as luminescent oxygen sensing material**. *Analytica Chimica Acta*, 1998, 360, 17-26.

- <sup>8</sup> Y-W. Lin, M-M. Hsieh, C-P. Liu, H-T. Chang, **Photoassisted synthesis of CdSe and core-shell CdSe/CdS quantum dots**. *Langmuir*, 2005, 21, 2, 728-734.
- <sup>9</sup> W. C. W. Chan, S. Nie, **Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection**. *Science*, 1998, 281, 2016-2018.
- <sup>10</sup> T. Pellegrino, L. Manna, S. Kudera, T. Liedl, D. Koktysh, A. L. Rogach, S. Keller, J. Rädler, G. Natile and W. J. Parak, **Hydrophobic nanocrystals coated with an amphiphilic polymer shell: A general route to water soluble nanocrystals**. *Nano Letters*, 2004, 4, 703-707.
- <sup>11</sup> M. T. Fernández-Argüelles, A. Yakolev, R. A. Sperling, C. Luccardini, S. Gaillard, A. Sanz-Medel, J. Mallet, J. Brochon, A. Feltz, M. Oheim, W. J. Parak, **Synthesis and characterization of polymer-coated quantum dots with integrated acceptor dyes as FRET-based nanoprobe**s. *Nano Letters*, 2007, 7, 2613-2617.
- <sup>12</sup> C-A. J. Lin, R. A. Sperling, J. K. Li, T-Y. Yang, P-Y. Li, M. Zanella, W. H. Chang, W. J. Parak, **Design of an amphiphilic polymer for nanoparticle coating and functionalization**. *Small*, 2008, 4, 3, 334-341.
- <sup>13</sup> T. C. Lim, V. J. Bailey, Y-P. Ho, T-H. Wang, **Intercalating dye as an acceptor in Quantum-dot-mediated FRET**. *Nanotechnology*, 2008, 19, 075701-.
- <sup>14</sup> A. R. Clapp, I. L. Medintz, H. Mattoussi, **Förster Resonance Energy Transfer investigations using Quantum-Dot fluorophores**. *A European Journal of Chemical Physics and Physical Chemistry*, 2006, 7, 47-57.
- <sup>15</sup> K. E. Sapsford, T. Pons, I. L. Medintz, H. Mattoussi, **Biosensing with luminescent semiconductor Quantum Dots**. *Sensors*, 2006, 6, 8, 925-953.
- <sup>16</sup> I. L. Medintz, A. R. Clapp, H. Mattoussi, E. R. Goldman, B. Fisher, M. Mauro, **Self-assembled nanoscale biosensors based on quantum dot FRET donors**. *Nature Materials*, 2003, 2, 630-638.
- <sup>17</sup> S. Hohng, T. Ha, **Single-molecule quantum-dot fluorescence resonance energy transfer**. *A European Journal of Chemical Physics and Physical Chemistry*, 2005, 6, 5, 956-960.
- <sup>18</sup> P. T. Snee, R. C. Somers, G. Nair, J. P. Zimmer, M. G. Bawendi, D. G. Nocera, **A ratiometric CdSe/ZnS nanocrystals pH sensor**. *Journal of the American Chemical Society*, 2006, 128, 41, 13320-13321.
- <sup>19</sup> C. Bullen, P. Mulvaney, C. Sada, M. Ferrari, A. Chiasera, A. Martucci, **Incorporation of a highly luminescent semiconductor quantum dots in ZrO<sub>2</sub>-SiO<sub>2</sub> hybrid sol-gel glass film**. *Journal of Materials Chemistry*, 2004, 14, 1112-1116.
- <sup>20</sup> W. J. Jin, J. M. Costa-Fernández, A. Sanz-Medel, **Room temperature phosphorescence pH optosensor based on energy transfer**. *Analytica Chimica Acta*, 2001, 431, 1, 1-9.

- <sup>21</sup> E. R. Goldman, I. L. Medintz, J. L. Whitley, A. Hayhurst, A. R. Clapp, H. T. Uyeda, J. R. Deschamps, **A hybrid quantum dot-antibody fragment fluorescence resonance energy transfer-based TNT Sensor**. *Journal of Analytical Chemical Society*, 2005, 127, 6744-6751.
- <sup>22</sup> L. Qu, X. Peng, **Control of photoluminescence properties of CdSe nanocrystals in growth**. *Journal of the American Chemical Society*, 2002, 124, 9, 2049-2055.
- <sup>23</sup> A. Y. Nazzal, L. Qu, X. Peng, M. Xiao, **Photoactivated CdSe nanocrystals as nanosensors for gases**. *Nano Letters*, 2003, 3, 6, 819-822.
- <sup>24</sup> R. A. Potyrailo, A. M. Leach, **Selective gas nanosensors with mutisize CdSe nanocrystal/polymer composite films and dynamic pattern recognition**. *Applied Physical Letters*, 2006, 88, 134110.
- <sup>25</sup> D. Yu. Godovsky, J. H. Kim, D. F. Zaretsky, S.S. Yakimov, **Harmonic modulation of impurity in gas flow as a method to study the semiconductor sensors**. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 1999, 58, 433-437.
- <sup>26</sup> B. S. V. de la Riva, J. M. Costa-Fernández, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, **Flow-through room temperatura phosphorescence optosensing for the determination of lead in sea water**. *Analytica Chimica Acta*, 1999, 395, 1-9.
- <sup>27</sup> J. Rodríguez-Fernández, J. M. Costa-Fernández, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, **Simple detector for oral malodour based on spectrofluorimetric measurement of hydrogen sulphide in mouth air**. *Analytica Chimica Acta*, 1999, 398, 23-31.
- <sup>28</sup> O. V. Vassiltsova, Z. Zhao, M. A. Petrukina, M. A. Carpenter, **Surface functionalized CdSe Quantum Dots for the detection of hydrocarbons**. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2007, 123, 1, 522-529.
- <sup>29</sup> E. T. Zellets, S. A. Batterman, M. Han, S. J. Patrasht, **Optimal coating selection for the analysis of organic vapor mixtures with polymer-coated surface acoustic wave sensor arrays**. *Analytical Chemistry*, 1995, 67, 1092-1106.
- <sup>30</sup> J. White, J. S. Kauer, **Rapid analyte recognition in a device based on optical sensors and the olfactory system**. *Analytical Chemistry*, 1996, 68, 2191-2202.
- <sup>31</sup> B. G. M. Vandeginste, D. L. Massart, L. M. C. Buydens, S. de Jong, P. J. Lewi, J. Smeyers-Webeke, *Handbook of chemometrics and qualimetrics, Part B*. Elsevier Science, B. V. Amsterdam, The Netherlands, 1998, 88-104.
- <sup>32</sup> I. T. Jolliffe, *Principal Component Analysis*, 2<sup>nd</sup> ed. Springer, New York, 2004.
- <sup>33</sup> D. L. Massart, B. G. M. Vandeginste, S. N. Deming, Y. Michotte, L. Kaufman, *Chemometrics: a textbook (Data handling in science and technology) Vol. 2*, Elsevier, Amsterdam-Oxford-New York-Tokyo- 1988. Chapter 21.

## **D.4 ENCAPSULACIÓN DE UN ACEPTOR EN EL RECUBRIMIENTO POLIMÉRICO DE LOS QDS: DESARROLLO DE UN SENSOR DE CALCIO BASADO EN FRET.**

### **D.4.1 Antecedentes y objetivos**

Una alternativa para extender el campo de aplicación de los “quantum dots” en Química Analítica está basada en el empleo de los nanocristales semiconductores como indicadores fluorescentes “pasivos”. Es decir, los nanocristales semiconductores no reaccionan de forma directa con el analito sino que actúan como marcadores fluorescentes que están convenientemente unidos a un elemento de reconocimiento apropiado, el cual será el responsable de llevar a cabo la detección selectiva del analito<sup>1</sup>.

Los QDs pueden actuar, además como especies donadoras en el diseño de sistemas analíticos basados en mecanismos de fluorescencia con transferencia de energía (FRET). En este sentido, ya se han desarrollado numerosos ensayos de bioanalíticos, en los cuales los QDs juegan un papel esencial en el proceso de transducción actuando como donadores de energía en procesos de FRET<sup>2,3</sup>. Debido a los anchos espectros de excitación, el empleo de los QDs como donadores permitiría monitorizar de forma simultánea varios pares donador/aceptor utilizando una única longitud de onda de excitación. Además otra ventaja que se presenta es que sus espectros de emisión estrechos y simétricos favorecen la reducción del solapamiento entre las emisiones del donador y acepto (en caso de ser fluorescente). Una característica especialmente interesante es que se puede ajustar de forma relativamente sencilla el solapamiento espectral entre la emisión del donador y la excitación del acepto variando el tamaño y/o la composición de la nanopartícula. El propio tamaño de los QDs es otra de sus atractivas propiedades para su empleo como donadores en procesos de FRET. Dada su elevada área superficial se pueden incorporar a la superficie del donador varias moléculas del acepto, lo que contribuye a incrementar la eficiencia del proceso de transferencia de energía. El tamaño nanométrico y las excepcionales propiedades ópticas de los QDs hacen de estos nanomateriales una plataforma muy atractiva para el desarrollo de biosensores. De entre toda la amplia variedad de nanomateriales disponibles, los nanocristales semiconductores son una de

las opciones más interesantes a la hora de crear estructuras híbridas (inorgánicos-biológicos) por sus excepcionales propiedades fotofísicas y electroquímicas<sup>4,5</sup>.

Mayoritariamente las metodologías desarrolladas que hacen uso de QDs y mecanismos de FRET están basados en un unión donador/aceptor de tal forma que la presencia del analito produce un desplazamiento de la posición del aceptador respecto a la del donador, con lo que se ve modificada la eficiencia del proceso de transferencia de energía por la presencia del analito en el medio.

Los sistemas donador/aceptor deben cumplir dos requisitos básicos:

1) En primer lugar el donador y el aceptador deben estar lo suficientemente cerca para que tenga lugar el proceso de transferencia de energía (además de que dicha unión sea estable).

2) En segundo lugar el sistema final debe poseer una buena estabilidad coloidal.

En este sentido, es necesario llegar a una situación de compromiso ya que cuando el aceptador se une directamente a la nanopartícula el sistema final aumenta de tamaño, por lo que la estabilidad coloidal puede verse reducida de forma que se pueden generar agregados e incluso se puede producir una pérdida de aceptador unido al donador<sup>6</sup>. Por otro lado, las alternativas desarrolladas en las que se estabilizan las nanopartículas mediante diferentes estrategias (adición de tensoactivos<sup>7</sup>, recubrimiento de sílice<sup>8</sup>, etc.) dan lugar a un aumento del diámetro final de la nanopartícula, con lo que se aumenta la distancia donador/aceptor reduciéndose la eficiencia del proceso FRET.

En el presente capítulo se pretende profundizar en el empleo de los QDs como donadores de un proceso de FRET. Se evaluará una nueva geometría de encapsulación/integración de un aceptador selectivo al analito de interés en las proximidades de la superficie del QD con objeto de favorecer el proceso de transferencia de energía. Lo que se pretende es desarrollar una estrategia general para la incorporación del aceptador dentro de la estructura del polímero anfifílico durante el proceso de recubrimiento/encapsulación de los QDs (donador) en dicho polímero anfifílico. Además de obtener la deseada estabilidad en medios acuosos de los semiconductores cristalinos, se pretende lograr la encapsulación del aceptador en las proximidades de la superficie del donador por medio de un procedimiento sencillo y general aplicable, *a priori*, a cualquier aceptador soluble en medios apolares. Una vez incorporado el aceptador en el recubrimiento polimérico del donador, se estudiarán las

características luminiscentes del nuevo sistema con el fin de confirmar el proceso de transferencia de energía entre el donador y el aceptor.

Como aceptor modelo se pretende utilizar un compuesto cuyas propiedades ópticas (absorbancia o fluorescencia) varíen en presencia de concentraciones crecientes de calcio en el medio. El objetivo final sería pues el diseño de un sistema sensor para la monitorización de la concentración de iones calcio en medios acuosos y/o biológicos.

Los iones de calcio<sup>9</sup> tienen un importante papel como mensajero en numerosas funciones biológicas incluyendo: la transducción de señales, la contracción muscular, la regulación de canales iónicos, la coagulación de la sangre, la formación del esqueleto e incluso en los procesos de señalización hormonal. Para estudiar el papel del calcio en estos procesos se requieren sensores sensibles y específicos capaces de controlar cambios rápidos en la concentración de dicho elemento en distintos medios fisiológicos. A nivel celular el calcio es un elemento esencial, y la visualización del mismo en zonas cercanas a los canales celulares es un aspecto ampliamente estudiado y demandado en el campo biológico. No obstante, a pesar de que existen compuestos indicadores para llevar a cabo la detección de dicho ión, los estudios fluorescentes se ven limitados por la propia autofluorescencia de la célula. Por otro lado, desde un punto de vista clínico la medida de calcio ionizado en sangre y suero es un parámetro de gran interés en diagnóstico clínico para diversas enfermedades como es el caso de metástasis de tumores o fallo renal.

De forma tradicional la determinación de la concentración de calcio en muestras de plasma y suero se lleva a cabo por medio de electrodos selectivos de iones. No obstante, el aumento del interés por dispositivos automatizados y portátiles (*point-of-care*) que empleen pequeños sensores desechables capaces de realizar la medida de forma directa p. ej. en sangre, ha favorecido el desarrollo de sensores ópticos prácticos y económicos para la determinación directa del parámetro clínico de interés<sup>10</sup>.

Las nanopartículas coloidales, como las nanopartículas de oro y los QDs, se han empleado en ensayos para la detección óptica de pequeños iones en disolución<sup>11</sup>. En este sentido las nanopartículas además de las ventajas anteriormente comentadas, se pueden emplear tanto como simples *sistemas portadores* de elementos sensibles a un determinado ión o bien como elementos *transductores*.

En el primer caso las nanopartículas actuaran como simples sistemas portadores del compuesto orgánico sensible al ión (normalmente un fluoróforo). Están disponibles comercialmente una gran variedad de fluoróforos orgánicos cuya emisión



depende de la presencia de iones específicos en el medio. Dichos compuestos se pueden acoplar a la superficie de la nanopartícula o en el interior de la capa polimérica empleada para solubilizar la nanopartícula. Esta unión puede presentar la ventaja de que se pueden concentrar varias moléculas del fluoróforo sobre una misma nanopartícula, lo que incrementaría la intensidad de la señal del fluoróforo puesto que se han concentrado varias unidades del mismo en un pequeño espacio. Además, aplicando esta misma estrategia se pueden incorporar varios fluoróforos de forma simultánea lo que permitiría llevar a cabo una determinación ratiométrica<sup>12</sup> del analito.

Además de actuar como simples portadores del fluoróforo, los QDs pueden modificar de forma activa las propiedades del fluoróforo. La unión de los fluoróforos a los quantum dots permite la modulación efectiva de los tiempos de vida de la fluorescencia del aceptor, lo que puede ser una ventaja p. ej. en procesos de detección por medio de medidas de tiempo resuelto<sup>13</sup>, en las cuales son deseables tiempos de vida largos para reducir los efectos de autofluorescencia celular.

Por otra lado hay que tener en cuenta que la unión de la nanopartícula con el aceptor (fluoróforo) podría modificar la respuesta del compuesto sensible al ión respecto a su comportamiento fuera de dicho entorno. La superficie de las nanopartículas habitualmente está cargada (en función del tipo de recubrimiento y del pH del trabajo), por lo que las concentraciones de iones en las proximidades de la superficie de la nanopartícula son diferentes de las que se encuentran en la disolución<sup>14</sup>. Esto se puede entender por medio de la aproximación de Debye-Hückel, es decir, la atracción de los contraiones<sup>15</sup>. Los fluoróforos inmovilizados sobre la superficie de la nanopartícula detectan la concentración local de iones y no la concentración global, ya que la propia carga de la nanopartícula modifica la concentración de iones del entorno. Este fenómeno tiene lugar siempre que se utilicen las nanopartículas cargadas, independientemente de que actúen como elementos pasivos o donadores en el proceso de monitorización de la concentración de iones. Puesto que la parte “*sensible al analito*” del sistema está garantizada por la presencia del fluoróforo en el sistema, se puede modificar la superficie de la nanopartícula de forma que se convierta al conjunto en un sistema más estable.

En el caso de emplear a los QDs como *transductores* en el proceso de detección de iones, la señal de fluorescencia de la nanopartícula se reduce o incrementa en presencia del ión (analito) sobre la superficie de la nanopartícula. Los QDs actuando

como sensores activos y elementos de transducción, se emplearon ampliamente en las primeras aplicaciones de las nanopartículas semiconductoras.

#### **D.4.2 Discusión de resultados.**

Existen diferentes esquemas para la detección óptica de calcio que hacen uso de distintas moléculas que pueden actuar como: intercambiadores de iones entre el ión medido y un protón monitorizado con un colorante indicador lipofílico sensible al pH<sup>16,17</sup>, colorantes sensibles al potencial con un conductor de iones neutro<sup>18</sup>, o como indicadores fluorescentes. La mayoría de los métodos analíticos basados en iones conductores neutros presentan una dependencia directa con el pH del medio (si se basan en un indicador de pH o intercambio de protones), o inestabilidades asociadas a la lixiviación de componentes críticos (si se basan en un ionóforo para extraer el catión de interés dentro de la membrana lipofílica), a menos que sus componentes estén inmovilizados covalentemente<sup>17</sup>. Por tanto los indicadores fluorescentes de calcio pueden llegar a constituir una buena opción para la detección de calcio. El primer indicador fluorescente para la detección de calcio intracelular fue utilizado por Tsien<sup>19</sup>. Durante los veinte años siguientes han aparecido publicaciones donde se recoge la síntesis de nuevos compuestos, la mayoría de ellos basados en el compuesto original. Sin embargo, tal y como se mencionó en la introducción de este capítulo, el empleo directo de estos fluoróforos presenta ciertos inconvenientes que podrían subsanarse mediante metodologías basadas en fenómenos de FRET.

Por todo ello, el primer paso consistió en la selección de un aceptor adecuado disponible comercialmente, y cuyas propiedades ópticas se modifiquen cuando se varía la concentración de calcio del medio. Inicialmente se seleccionaron dos compuestos (*ETH 1001* y *ETH 5294*) que empleados de forma conjunta variaban su absorbancia en función de la cantidad de calcio presente en el medio. Por otro lado se seleccionaron dos colorantes fluorescentes sensibles al calcio (*Calcium Crimson* y *X-Rhod-1*) cuya fluorescencia se incrementa en presencia de dicho ión el medio.

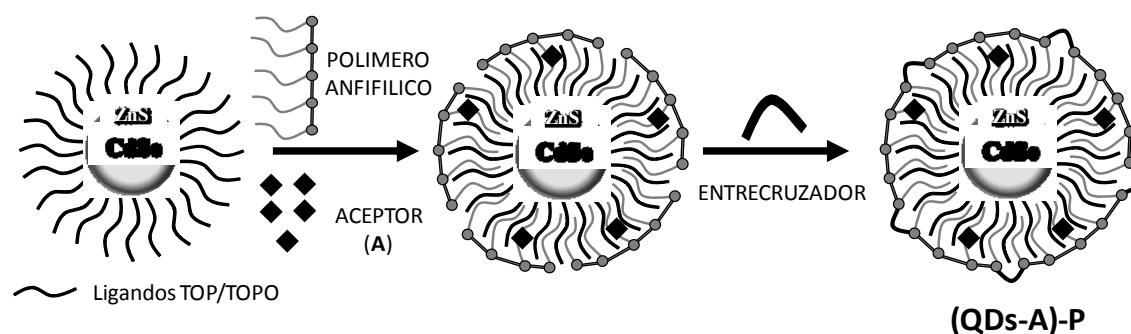
##### **D.4.2.1 Inmovilización del aceptor sensible al Calcio sobre la superficie del QD.**

Para incorporar de forma genérica el aceptor de interés sobre la superficie de la nanopartícula semiconductoras (independientemente de su estructura química) se hizo

uso del propio proceso de modificación de los quantum dots de CdSe/ZnS con el polímero anfifílico (QDs-P).

Como se ha comentado previamente en la sección Experimental (*Ver C.3.4*) con objeto de dar estabilidad a los QDs en medio acuoso se utiliza un polímero anfifílico para recubrir su superficie. Por otro lado, el proceso de solubilización de los QDs utilizando un recubrimiento polimérico permitirá encapsular de forma sencilla dentro de las cadenas alifáticas de polímero moléculas apolares de especies químicasceptoras de energía, para así favorecer el fenómeno de transferencia de energía desde el donador (QDs) a dichas moléculas, mejorando la eficiencia del proceso de FRET. En este caso, el recubrimiento de los QDs se llevó a cabo siguiendo el protocolo C.3.4 descrito en la sección experimental pero con ligeras modificaciones (*Figura 61*).

A la hora de llevar a cabo el recubrimiento de las nanopartículas, y para reducir el número de variables que pueden influir sobre la estructura del sistema obtenido, en todos los casos se utilizó una concentración fija de QDs en torno a 1  $\mu\text{M}$ . De esta forma se pretendía mantener constante la cantidad de polímero necesario durante el proceso de recubrimiento, de modo que el único parámetro a variar a la hora de preparar diferentes sistemas donador-aceptor será el porcentaje de especie aceptora que se añade durante la preparación del conjugado. El porcentaje de aceptor se expresa como moles de aceptor respecto a la cantidad total de unidades de monómero necesaria para llevar a cabo el recubrimiento de la muestra de QDs.



**Figura 61.** Esquema del proceso de solubilización y encapsulamiento del aceptor en el recubrimiento polimérico de los QDs.

En una preparación típica del sistema donador-aceptor, durante la etapa de solubilización acuosa de los QDs se incorpora la especie aceptora. Así, a una disolución de QDs de CdSe/ZnS dispersos en cloroformo de concentración 1  $\mu\text{M}$  se le añade, además de la cantidad calculada de polímero (*Ver C.3.4*), la cantidad apropiada de aceptor disuelto también en cloroformo. Tras la mezcla de la disolución final, se somete

a la disolución a un proceso de agitación y posterior evaporación controlada a sequedad en rotavapor. Para estabilizar la estructura final la muestra seca obtenida se re-disuelve en cloroformo añadiendo la cantidad adecuada de bis-hexametilentriamina 0,02 M (entrecruzador), llevándose nuevamente la disolución a sequedad. El sólido final obtenido se re-dispersa en una disolución reguladora de pH 12. En este caso como trabajamos con volúmenes de muestra muy pequeños ( $\cong 1$  mL), evitamos la etapa de filtración (filtro de 0,22  $\mu\text{m}$ ) para no perder una gran parte de la muestra durante el proceso de filtrado.

Inicialmente se utilizó como disolución reguladora tras la etapa de modificación con polímero anfifílico una disolución básica de SBB de pH 12 (siguiendo el protocolo habitual del recubrimiento). Sin embargo, durante una etapa posterior de modificación del pH (*Ver C.3.5*) de las muestras desde el medio básico al pH de trabajo buscado surgieron problemas experimentales. A lo largo del proceso de ultrafiltración, los QDs conjugados con el aceptor sintetizado se quedaban adheridos sobre la superficie de celulosa que constituye el filtro de paso de 100 kDa. Para evitar desestabilizar la estructura sintetizada se decidió omitir la etapa de modificación del pH del medio por medio de filtros de membrana, optando por añadir tras la segunda etapa de evaporación controlada 1 mL de agua desionizada MQ y 10  $\mu\text{L}$  de una disolución NaOH 6 M, para poder obtener ese mismo medio básico sin introducir gran cantidad de sales en la muestra obtenida. El objetivo de este estudio es evitar utilizar una disolución reguladora, ya que a partir de ahora se pretende tener los QDs con el aceptor atrapado sobre su superficie ((QDs-A)-P) a diferentes pH por simple dilución de un pequeño volumen de nuestra sonda indicadora ((QDs-A)-P) sobre un volumen mucho más elevado de la disolución reguladora con la que se desee trabajar.

Empleando únicamente la mezcla de aceptores espectrofotométricos seleccionados se llevaron a cabo una serie de estudios encaminados a evaluar la importancia del orden de incorporación de los reactivos durante el proceso de recubrimiento, así como la necesidad de utilizar el entrecruzador en la etapa final de la modificación. De esta forma, se evaluó:

a) la posibilidad de incorporar conjuntamente el aceptor, el polímero y el QD en un primer paso antes de comenzar la primera etapa de evaporación.

b) preparar una mezcla inicial del aceptor y polímero someterla a un proceso de evaporación y posteriormente añadir la disolución de QDs y proseguir con el proceso de modificación original.

c) preparar una mezcla inicial de QDs y aceptor sometiéndola a un proceso de evaporación, posterior re-dispersión en medio orgánico con la consiguiente adición del polímero, y continuación con el proceso normal de modificación.

Todas estas disoluciones se prepararon por duplicado, añadiéndose a una de las alícuotas el reactivo entrecruzador, y en el caso de la segunda alícuota se omitió este paso.

Como conclusiones a este estudio se puede decir que en todos los casos era necesaria la etapa final de adición del entrecruzador para obtener una estructura final más estable (con un primer excitón del espectro de absorbancia más definido). Por otro lado, en cuanto al orden de adición de los reactivos, basándonos en la intensidad de las emisiones fluorescentes podemos decir que la incorporación de los reactivos según el orden a) y c) produce sistemas con similares propiedades ópticas, mejores que en el caso b). Por tanto se estableció como orden de preferente de adición de los reactivos el descrito en a), es decir, la adición de los reactivos se realiza de acuerdo con el protocolo tradicional, incorporando el aceptor en la mezcla inicial.

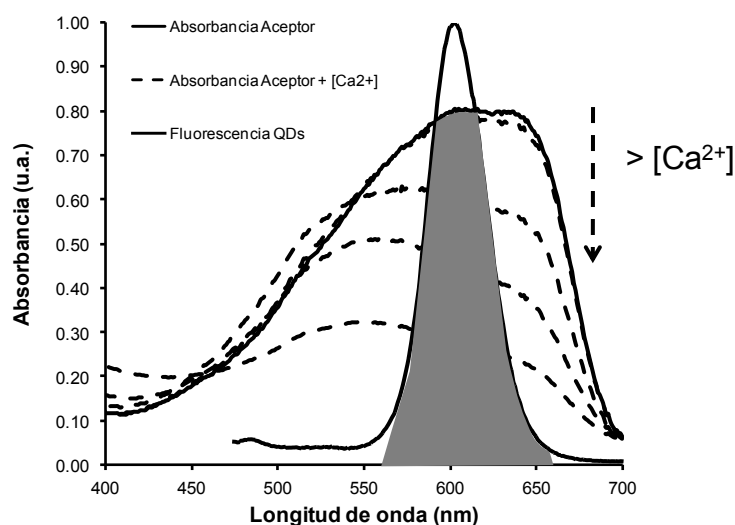
#### **D.4.2.2 Selección de un indicador espectrofotométrico. Comportamiento espectrofotométrico de la mezcla de aceptores sensibles al Calcio.**

En una primera etapa, para el desarrollo de un sistema indicador de calcio, se llevó a cabo una búsqueda bibliográfica y selección de indicadores espectrofotométricos sensibles a dicho ión en disolución disponibles comercialmente. Se eligió como indicador espectrofotométrico una mezcla de dos compuestos: un cromoionóforo ETH 5294 (N-Octadecanoyl-Nile blue) y un ionóforo ETH 1001 (*Diethyl N,N'-[(4R,5R)-4,5-dimethyl-1,8-dioxo-3,6-dioxaoctamethylene] bis(12methylaminododecanoate)*) cuya mezcla es sensible a la presencia de calcio en disolución. Con el objetivo de intentar mejorar la sensibilidad y selectividad de la detección se emplearon dichos indicadores para el desarrollo de un proceso FRET junto con los QDs.

En una primera etapa se estudió el comportamiento espectrofotométrico de la mezcla de indicadores espectrofotométricos ETH 1001 y ETH 5294 incorporados en el interior de la estructura polimérica (**A-P**) para comprobar que siguen respondiendo a la presencia de calcio.

Para ello se prepararon una serie de disoluciones (*Ver D.4.2.1*) conteniendo las especies colorantes sensibles al calcio, incorporada en la matriz polimérica empleada para solubilizar las nanopartículas, pero en ausencia de QDs (**A-P**). Las muestras se

prepararon con un 0,5 % de aceptor ETH 5294 (la concentración de ETH 1001 presente en la muestra siempre era cuatro veces superior a la de ETH 5294<sup>16,20</sup>). La estructura sintetizada A-P dispersa en medio básico se diluye posteriormente en una disolución reguladora de pH 6 de HAc/ Ac. El intervalo de respuesta al calcio de estos indicadores está entre  $10^{-5}$  y  $10^{-1}$  M. El tiempo de incubación tras cada adición de calcio en la mezcla (antes de realizar la medida espectrofotométrica) se fijó en 30 minutos. Se obtuvo (Ver Figura 62) un decrecimiento de la absorbancia entre concentraciones de calcio del orden de  $10^{-5}$  y  $10^{-3}$  M (0 - 4 mM). A mayores concentraciones de calcio en el medio el sistema A-P se desestabilizaba, y no se modificaba la absorbancia.



**Figura 62.** Variación del espectro de absorbancia de la mezcla de indicadores (ETH 1001 + ETH 5294) en presencia de concentraciones crecientes de calcio en el medio, y solapamiento entre el espectro de absorbancia de la mezcla de aceptores y el espectro de emisión fluorescente de los QDs de CdSe/ZnS.

Es preciso señalar que, buscando obtener una máxima sensibilidad de la especie (A-P) frente al calcio se optimizaron una serie de parámetros entre los cuales se incluyen: pH, % de aceptor, relación entre los aceptores y tiempo de incubación. Así, se ensayaron diferentes pH (5,4; 6; 6,5) empleando una disolución reguladora de HAc/ AcNa, seleccionándose finalmente el pH 6 como el pH óptimo. Otra variable optimizada fue el porcentaje de aceptor ETH 5294 respecto a la cantidad de polímero (0,01%; 0,025%; 0,05%; 0,10%; 0,25%; 0,50%; 1%) optando al final por un valor óptimo de 0,5 %. En cuanto al tiempo de incubación de cada muestra tras la adición de calcio, se estudiaron tiempos entre 0 y 60 minutos, y se optó finalmente por 30 minutos.

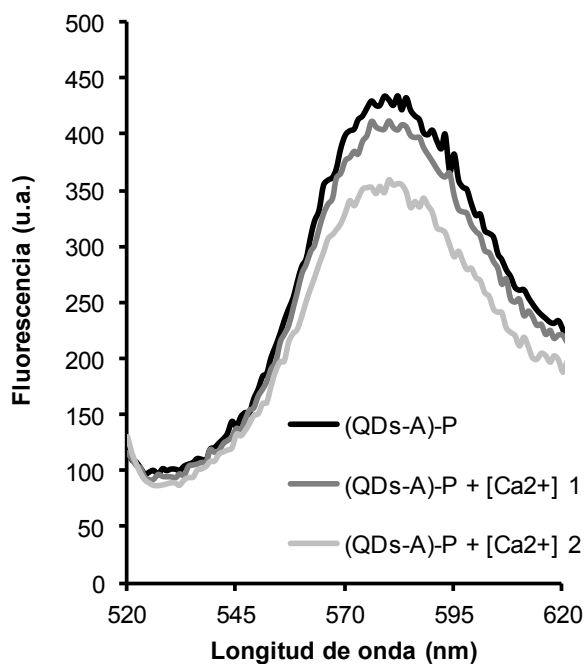
#### **D.4.2.3 Estudio de la respuesta fluorescente del sistema (QDs-A)-P frente al Calcio: A= ETH 1001 + ETH 5294**

Una vez optimizados los parámetros anteriores se procedió a la síntesis de varias sondas indicadoras de calcio (QDs-A)-P. Para ello se seleccionaron QDs de CdSe/ZnS con una emisión centrada en los 600 nm, para conseguir un buen solapamiento espectral con la absorbancia de la mezcla de colorantes como se puede observar en la Figura 62. En primer lugar se monitorizaron los espectros de emisión de QDs-P en presencia y ausencia de la mezcla de colorantes observándose un ligera disminución en la señal de intensidad de fluorescencia procedente del donador, debido al solapamiento espectral existente entre la emisión de los QDs (donador) y la absorbancia del aceptor (ETH 1001 + ETH 5294). No obstante, desafortunadamente, cuando a la muestra (QDs-A)-P se le añadieron concentraciones crecientes de calcio en el medio no se registró ninguna variación sobre la señal de fluorescencia de los QDs.

Ante la falta de respuesta por parte del sistema (QDs-A)-P sintetizado se decidió intentar optimizar nuevamente la relación de colorantes ETH 1001/ETH 5294 (seleccionada en el estudio anterior en una relación 4:1) llegando incluso a utilizar relaciones 8:1. Desafortunadamente, de nuevo, no se obtuvo ningún tipo de mejora analítica, por lo que se decidió re-optimizar el porcentaje de aceptor presente en el sistema (QDs-A)-P (0,10%; 0,25%; 0,50%). Tampoco esta vía ofreció ninguna mejora al proceso de detección de calcio.

En todos los casos se observaba una reducción de la intensidad de luminiscencia de los QDs a medida que se incrementaba la concentración de calcio en el medio, comportamiento totalmente opuesto al esperado como podemos ver en la Figura 63. Esta disminución en la intensidad de fluorescencia se atribuyó con gran probabilidad a un efecto de dilución (al añadir disolución de calcio). Además, se cree que la estabilidad del sistema va disminuyendo a medida que se incrementa la concentración del analito (calcio) en el medio, provocando finalmente la ruptura final del conjunto (QDs-A)-P de modo que la señal luminiscente monitorizada disminuye, lo que explica el fenómeno observado en la Figura 63. También hay que tener en cuenta en el caso del reactivo ETH 1001, que éste es sensible a la presencia del aire, por lo que a pesar de tomar las debidas precauciones durante su manejo a lo largo del proceso de modificación de la nanopartícula y el proceso de medida, dicho reactivo puede haber resultado dañado.

Estudios de variación de la temperatura de incubación y de fotoactivación del sistema (QDs-A)-P tampoco dieron lugar a una respuesta favorable del sensor.



**Figura 63.** Respuesta del sistema (QDs-A)-P donde A= ETH 1001 + ETH 5294 ante concentraciones crecientes de calcio en el medio ( $[Ca^{2+}] = 0,2$  y  $2,2$  mM).

#### **D.4.2.4 Selección de indicadores de Calcio fluorescentes: Estudio de la respuesta luminiscente al calcio.**

A raíz de los resultados negativos obtenidos empleando la mezcla de aceptores espectrofotométricos, se decidió buscar y seleccionar un nuevo indicador sensible al calcio que actuase nuevamente como aceptor en el diseño de un sistema FRET. En este caso se optó por seleccionar fluoróforos muy sensibles a la presencia de calcio en el medio. La mayoría de los estos fluoróforos presentan longitudes de onda de emisión y excitación muy próximas entre sí, lo que en la práctica limita su aplicabilidad, de ahí el interés en desarrollar un sistema FRET indicador para poder utilizar longitudes de excitación alejadas de la propia emisión del aceptor.

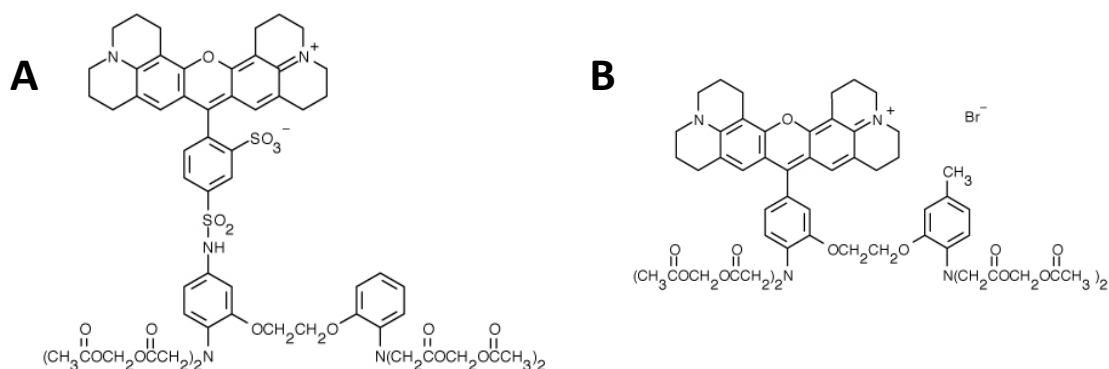
Los indicadores químicos descritos para la detección de calcio permiten la detección a nivel intracelular en un amplio rango ( $<50$  nM- $>50$   $\mu$ M). Los indicadores de elevada afinidad pueden ser empleados para cuantificar calcio en el citosol mientras que los indicadores de baja afinidad pueden ser optimizados para la medida de calcio en los compartimentos subcelulares que presentan elevadas concentraciones<sup>21</sup>. Además de la fortaleza y velocidad de la unión del calcio al indicador, las variaciones



espectrales en función de la presencia de calcio que tienen lugar deben ser consideradas cuidadosamente. Los indicadores de calcio se pueden clasificar como ratiométricos o indicadores de una única longitud de onda. Los indicadores de una única longitud de onda presentan variaciones de la intensidad de fluorescencia sin modificar sus longitudes de onda de excitación y de emisión. Los indicadores ratiométricos por su parte modifican bien su espectro de excitación o emisión tras su unión con el calcio.

La constante de disociación ( $K_d$ ) (o su inversa la constante de asociación  $K_a$ ), describe como de fuerte o ajustada puede ser la unión entre el indicador y los iones calcio. La  $K_d$  tiene unidades de molaridad, y se corresponde con la concentración de calcio a la cual la mitad de las moléculas indicadoras se encuentran unidas a calcio en equilibrio. Cuando sea posible, los indicadores deben emplearse para medir concentraciones de calcio entre 0,1 y 10 veces el valor de su  $K_d$ , ya que este es el intervalo en el cual las variaciones fluorescentes dependientes del calcio son mayores. Es importante indicar que el valor de la  $K_d$  depende de la temperatura, el valor de pH, la viscosidad, la fuerza iónica, la unión de proteínas y la cantidad de cationes de magnesio y otros iones presentes. Por tanto, la  $K_d$  de un indicador específico *in vitro* puede no tener el mismo valor de  $K_d$  que *in vivo*. Para una calibración exacta de los niveles de calcio, es necesaria la medida empírica del valor de  $K_d$  *in situ*, no solamente para un tipo de células específicas, sino también en cada compartimento subcelular.

Entre los indicadores fluorescentes para la medida de calcio disponibles comercialmente se seleccionaron *Calcium Crimson* y *X-Rhod-1* como aceptores.



**Figura 64.** Estructura química del A) *Calcium Crimson* y B) *X-Rhod-1*.

El *Calcium Crimson* es un indicador fluorescente de calcio basado en la estructura de los colorantes tetrametilrodamina y Texas Red (Ver Figura 64A) con

espectros de absorción y emisión similares. La afinidad por el calcio es relativamente elevada ( $K_d = 170-185$  nM), y el máximo de excitación en este caso está desplazado hacia longitudes de onda largas, haciendo de este colorante un buen candidato en el caso de tejidos con una elevada autofluorescencia. Los indicadores fluorescentes de longitudes de onda largas ofrecen una serie de ventajas. Su emisión se encuentra en una región del espectro donde los fondos de autofluorescencia y dispersión son a menudo más bajos, de forma que se reduce el problema de la autofluorescencia. Otra ventaja de este indicador es que la energía de la luz de excitación necesaria es baja (longitud de onda largas), reduciéndose así el potencial daño celular causado por la energía de la luz. Además, la longitud de onda necesaria para la excitación óptima es compatible con cualquiera de las producidas por la instrumentación laser. En el caso del Calcium Crimson la longitud de excitación corresponde a 590 nm y la de emisión a 615 nm. Después de la unión con calcio, presenta un incremento en la intensidad de emisión de fluorescencia del orden de 2,5 veces, con una pequeña variación en la longitud de onda del máximo de emisión.

Por otro lado, el **X-Rhod-1** es un indicador fluorescente de calcio basado en la estructura de la tetrametilrodamina (*Ver* Figura 64B), con espectro de absorción y emisión similares. La  $K_d$  de este compuesto es de 700 nM. La longitud de onda de excitación es de 580 nm y en torno a 602 nm está su correspondiente longitud de onda de emisión. No obstante, en este caso el potencial incremento de la fluorescencia del colorante es de unas 100 veces tras su unión al calcio presente en el medio.

Una vez seleccionados ambos indicadores sensibles a la presencia de calcio en el medio, el primer paso consistió en evaluar su comportamiento dentro del propio entorno donde van a ser utilizados, es decir, encapsulados en el interior del polímero anfífilico, como hemos hecho en el caso de la mezcla de aceptores espectrofotométricos anterior. Para ello se dispone de la información proporcionada por la casa comercial acerca de las longitudes de onda de excitación y de emisión óptimas para cada colorante, y de valores aproximados de sus constantes de asociación con el calcio para unas determinadas condiciones óptimas, que como se mencionó previamente, depende muchos factores como el pH del medio y de la presencia de otros iones en disolución.

Se prepararon muestras de ambos indicadores fluorescentes encapsulados dentro del polímero a dos niveles diferentes de aceptor 0,05 % y 0,1 % respecto a la cantidad de polímero en ambos casos. Se siguió el mismo protocolo para la preparación de muestra que se recoge en la sección D.4.2.1, pero en ausencia de QDs.

Como disolución reguladora durante estas pruebas se utilizó una disolución de TRIS (*tris(hidroximetil)aminometano*) 50 mM de pH 7,2 (es el pH óptimo de trabajo de estos indicadores según la información proporcionada por la casa comercial).

En el caso de las muestras de A-P donde A es el Calcium Crimson no se observó ningún tipo de variación de la señal de fluorescencia a medida que se incrementaba la concentración de calcio en el medio (La longitud de onda de excitación y emisión variaron ligeramente en las condiciones de trabajo respecto a las esperadas,  $\lambda_{ex} = 570$  nm;  $\lambda_{em} = 610$  nm). En el segundo caso A-P, donde A es el X-Rhod-1, se observó un ligero incremento en la señal de fluorescencia a medida que aumentaba la concentración de calcio de la muestra en el medio ( $[Ca^{2+}] = 20-400 \mu M$ ), pero tras las adiciones iniciales de calcio a la muestra la señal permanece estable, lo que podría indicar que el indicador está saturado.

Como fuente de iones para la preparación de los patrones de  $Ca^{2+}$  se utilizó  $CaCl_2$ , por lo que en primer lugar se procedió a utilizar otra fuente de iones en caso de que este aspecto pudiese tener alguna influencia en la respuesta de nuestro indicador. Como fuente alternativa se utilizó un patrón de calcio para ICP-MS ( $CaCO_3$  en  $HNO_3$  2-5%). Tras llevar a cabo los mismos estudios de adiciones de calcio utilizando la nueva fuente de iones, no se obtuvo ninguna mejora en la respuesta de ambos indicadores fluorescentes, incluso cuando se alcanzaban concentraciones de calcio del orden de mM.

Tras consultar la bibliografía, se optó por emplear otro tipo de disolución reguladora como alternativa. Se optó por una disolución de MOPS-KCl preparada a partir de una mezcla 10 mM de ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS) y 100 mM de KCl. La repetición del mismo estudio del comportamiento de ambos sistemas A-P en el nuevo medio proporcionó una respuesta similar a la obtenida en la disolución reguladora de TRIS.

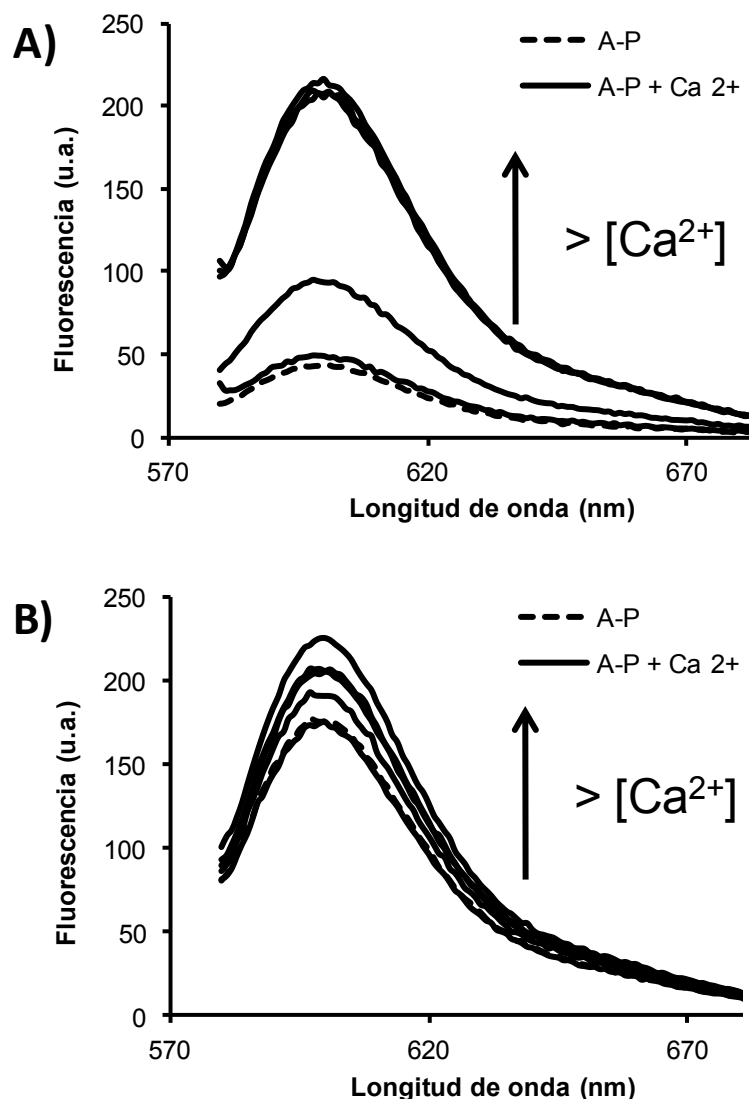
Como estos indicadores son teóricamente muy sensibles a pequeñas concentraciones de calcio en el medio, y puesto que se observaba una señal de fluorescencia por parte de ambos compuestos incluso antes de que tuviera lugar la adición del patrón de calcio, se planteó que quizá el medio en el que se dispersa el sistema A-P contenga una cantidad importante de calcio aportada por las sales empleadas para la preparación de la disolución reguladora.

En efecto, se comprobó que muchas de las sales empleadas en la preparación de las disoluciones reguladoras contenían ciertas impurezas de calcio, en algunos casos

del orden de 0,005% en peso. Así, teniendo en cuenta el porcentaje de impurezas de cada reactivo (en los casos en los que se indicaba en la etiqueta informativa del producto) se estimó la concentración teórica de calcio en la disolución reguladora. En el caso del TRIS la concentración de calcio estimada resultó ser del orden de  $10^{-7}$  M, mientras que en el caso del MOPS-KCl los niveles eran aún más elevados, del orden de  $10^{-5}$  M. A la vista de estos resultados, se puede concluir que las disoluciones reguladoras empleadas tienen concentraciones de calcio del orden de las que ya pueden detectar nuestros indicadores (de ahí la señal fluorescente que se observaba inicialmente).

Con objeto de reducir tanto la concentración de calcio en la disolución reguladora, como de otros posibles metales que puedan interferir, se utilizó una resina de intercambio *Chelex 100*. La resina Chelex es una resina quelante de intercambio iónico con una selectividad hacia los cationes divalentes sobre los iones monovalentes de 5000 a 1, y presenta una fuerte atracción por los metales de transición incluso en disoluciones salinas de concentración elevada. Entre las potenciales aplicaciones de esta resina está la eliminación de calcio de una disolución reguladora<sup>22,23</sup>. La resina puede ser utilizada empaquetada en una columna o bien se puede añadir directamente a la disolución reguladora que pretendemos purificar. En este último caso, generalmente, se añaden unos 5 gramos de resina por cada 100 mL de muestra; a continuación se agita la muestra durante una hora, y finalmente se decanta o filtra la muestra para eliminar la resina que hemos añadido.

Una vez purificadas las disoluciones reguladoras, el siguiente paso consistió en dispersar los mismos sistemas de A-P en la disolución reguladora de MOPS-KCl de pH 7,2 purificada con la resina Chelex. Durante el nuevo estudio de la respuesta fluorescente del indicador X-Rhod-1 frente a concentraciones crecientes del analito, si se observó un importante incremento en la respuesta del indicador fluorescente, tal y como se puede ver en la *Figura 65A*. También se llevó a cabo el mismo estudio con la disolución reguladora de TRIS para evaluar la potencial mejora de la respuesta tras la purificación de la disolución reguladora, pero en este caso el incremento en la señal de fluorescencia fue mucho menor comparado con el incremento de la señal en el medio MOPS-KCl para los mismo niveles de concentración de calcio, ya que la señal inicial obtenida era ya superior (*Ver Figura 65B*).



**Figura 65.** Respuesta del indicador fluorescente sensible al calcio X-Rhod-1 atrapado en interior del polímero PMA75C12 A) en una disolución reguladora de pH 7,2 de MOPS-KCl y B) en una disolución reguladora de TRIS de pH 7,2 ambas purificadas con resina Chelex.

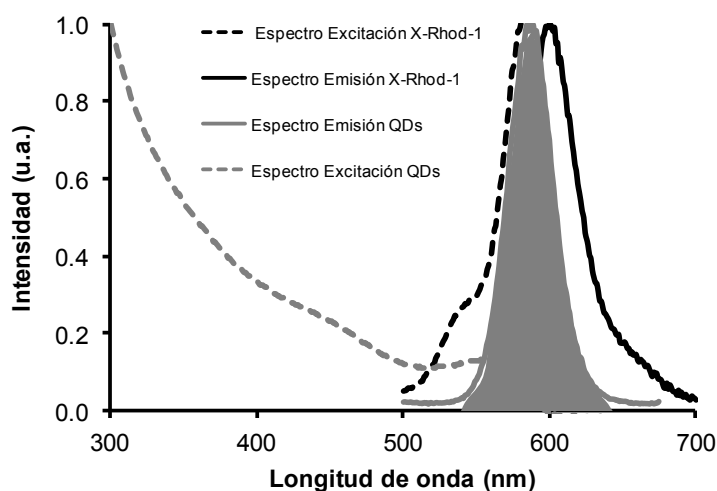
Por lo tanto, a la vista de estos resultados, a partir de este momento se seleccionó como disolución reguladora el MOPS-KCl de pH 7,2 para los experimentos a realizar.

El mismo estudio que el realizado para el X-Rhod-1 se llevó a cabo con el indicador Calcium Crimson. Sin embargo, en este último caso no se observó ninguna mejora en la respuesta del indicador, ni tras el cambio de la disolución reguladora, ni tras la etapa de purificación de las disoluciones reguladoras con Chelex. Por tanto a partir de ese momento se descartó definitivamente el Calcium Crimson como potencial

aceptor, y cuando nos refiramos al aceptor A estaremos hablando únicamente del X-Rhod-1.

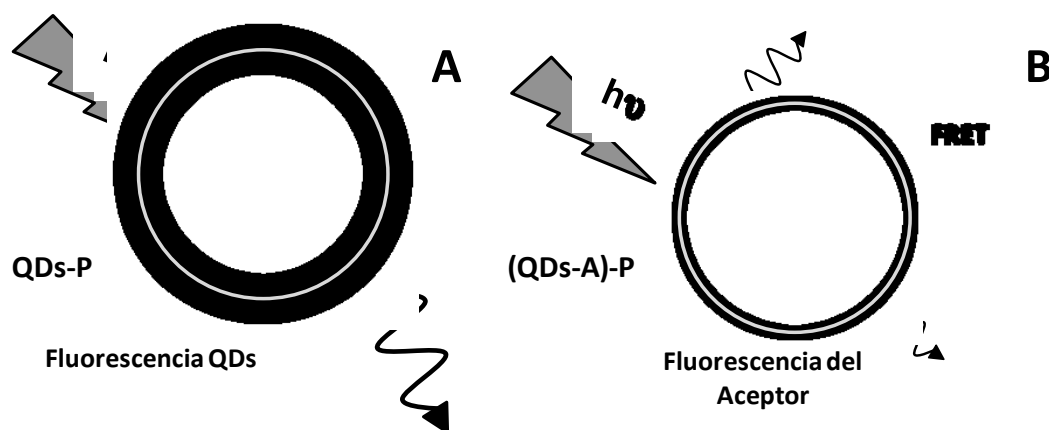
#### D.4.2.5 Estudio de la respuesta del sistema (QDs-A)-P: A = X-Rhod-1

Una vez comprobado que uno de los indicadores presenta una respuesta ante la presencia de calcio en el medio cuando se encuentra atrapado en el interior de la estructura polimérica, se procedió a realizar la síntesis de varias sondas indicadoras de calcio (QDs-A)-P conteniendo diferentes porcentajes de indicador fluorescente. Para ello se sintetizaron QDs de CdSe/ZnS con una emisión centrada en 585 nm, con objeto de conseguir un buen solapamiento espectral con el espectro de excitación del X-Rhod-1 (Ver Figura 66).



**Figura 66.** Solapamiento entre el espectro de excitación del colorante X-Rhod-1 y el espectro de emisión de los QDs de CdSe/ZnS.

Una vez obtenidos los QDs dispersos en cloroformo se procedió a realizar el recubrimiento de la superficie con el polímero anfílico PMA75C12 en presencia de la cantidad necesaria de X-Rhod-1. Se prepararon muestras con diferentes porcentajes de X-Rhod-1 (0,001%; 0,02%; 0,03%; 0,05%) manteniendo constante la concentración de QDs en torno a 1  $\mu$ M esperando obtener un sistema como el que se representa en la Figura 67.



**Figura 67.** Esquema representativo de la plataforma para el desarrollo del sensor de calcio A) Fluorescencia del sistema QDs-P cuando se excita a la longitud de onda propia de los semiconductores cristalinos. B) Fluorescencia del sistema (QDs-A)-P: cuando el aceptor está integrado en el interior del sistema la emisión de luz por parte de los QDs provoca la excitación y posterior emisión por parte del aceptor si este se encuentra unido a calcio presente en disolución.

Con objeto de evitar el proceso de cambio de pH de disolución de sonda indicadora por medio de los dispositivos de centrifugación (ya que se ha demostrado que en dicha etapa tiene lugar una importante pérdida de las nanopartículas funcionalizadas), se optimizó la dilución de la sonda indicadora para trabajar al pH de interés, en este caso de 7,2. Se decidió diluir la sonda de calcio tras el proceso de recubrimiento con el polímero anfifílico (en lugar de utilizar la reguladora de SBB pH 12 y el posterior cambio por ultracentrifugación) en un volumen de 1 mL de agua desionizada MQ y 10  $\mu\text{L}$  de una disolución NaOH 6 M, evitando así añadir un mayor número de impurezas metálicas a la disolución que pudieran interferir en la señal fluorescente del aceptor sensible al calcio. Se toma una alícuota de la disolución preparada que contiene QDs-A-P, y se diluye directamente en 1 mL de la reguladora de MOPS-KCl previamente purificada con Chelex.

En los primeros estudios llevados a cabo para evaluar la respuesta de las sondas QDs-A-P preparadas no se observó respuesta alguna frente a la presencia de calcio cuando se utilizaba como longitud de excitación las propias de los QDs. Se evaluaron como longitudes de onda de excitación 250 nm, 300 nm y 350 nm, no observando, en ningún caso, un incremento de la señal fluorescente de aceptor a 600 nm por el incremento de la concentración de calcio en el medio. Ante la posibilidad de que la proporción de QDs presente en la disolución para la preparación de la sonda

fluorescente fuese insuficiente se decidió preparar disoluciones precursoras con el doble ( $2 \mu\text{M}$ ) y el triple ( $3 \mu\text{M}$ ) de la cantidad de QDs, manteniendo constante la cantidad de X-Rhod-1 presente durante la preparación de la sonda de calcio.

En este estudio se seleccionó trabajar con una cantidad de 0,05 % de X-Rhod-1 respecto al número de monómeros de polímero presente en la disolución precursora. No obstante, hay que tener en cuenta que, a medida que aumenta la cantidad de QDs de CdSe/ZnS en la disolución, se incrementa implícitamente la cantidad de polímero que debemos incorporar. El porcentaje de 0,05% fue seleccionado ya que cuando se llevaron a cabo estudios preliminares no se observó ningún problema a la hora de detectar la señal procedente del X-Rhod-1. Desafortunadamente, una vez más no se observó ningún tipo de respuesta de la fluorescencia del X-Rhod-1 en presencia del calcio cuando se excitaba la sonda de calcio a la longitud de onda típica del QD, e incluso después de llevar a cabo la fotoactivación de la misma para mejorar la señal procedente de los QDs.

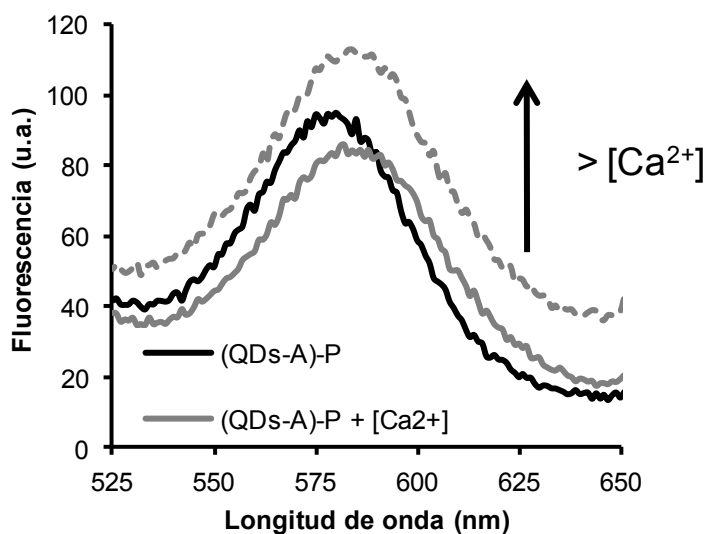
Puesto que no se obtuvo una mejora en la respuesta al incrementara la cantidad de QDs se volvió a trabajar con la concentración de QDs de  $1 \mu\text{M}$ . Con objeto de emplear en el sistema (QDs-A)-P la mínima cantidad de X-Rhod-1, se llevaron a cabo adiciones de una disolución de X-Rhod-1 en medio orgánico sobre una disolución de QDs  $1 \mu\text{M}$  en cloroformo. Se estimó que un porcentaje de colorante de 0,002% con respecto a la cantidad de monómero del polímero era suficiente a la hora de preparar las disoluciones de sonda indicadora (QDs-A)-P, ya que en la propia mezcla precursora ya se observaban tanto las señales propias del QDs como del X-Rhod-1 a sus longitudes de onda de excitación óptimas.

Una vez preparada la sonda (QDs-A)-P, se estudió su comportamiento frente a las adiciones crecientes de calcio, no observándose de nuevo ninguna variación de la señal de fluorescencia del indicador a la longitud de onda de excitación de los QDs ( $350 \text{ nm}$ ) ni tampoco variación alguna de la señal a la longitud de onda de excitación óptima del indicador  $570 \text{ nm}$ .

De ahí que considerando que en el caso del estudio de las respuesta del sistema A-P se habían conseguido mejoras con la purificación de la disolución reguladora por medio de la resina Chelex, se decidió volver a utilizar dicha resina para purificar, no solo la disolución reguladora de MOPS-KCl, sino también la propia sonda de calcio (QDs-A)-P ya diluida. Tras esta nueva etapa de purificación, como se puede ver en la



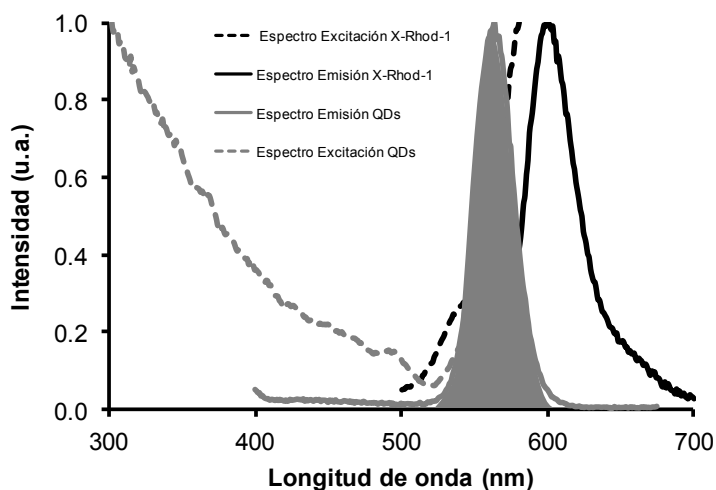
Figura 68 pudimos observar algún cambio significativo de la intensidad de fluorescencia de la sonda QDs-A-P por la presencia de calcio en el medio.



**Figura 68.** Respuesta del sistema QDs-A-P ( $A = X\text{-Rhod-1}$ ) una vez purificado con resina Chelex frente a diferentes concentraciones de calcio en el medio. Condiciones:  $\lambda_{exc} = 350 \text{ nm}$ , rendijas 20/20 nm y voltaje del PMT 700 V.

Este hecho de observar cambios tan leves de la señal luminiscentes podría ser debido a que se está monitorizando (de forma parcialmente solapada) la señal del fluoróforo sensible al calcio junto con la propia emisión de los QDs. De este modo, para intentar obtener una mejor respuesta a la presencia de calcio se pensó en utilizar unos QDs de CdSe/ZnS de emisión inferior, más centrada en 570 nm, con objeto de evitar que las señales de ambos compuestos fluorescentes estuviesen solapadas. Como se puede observar en la Figura 69, al realizar la medida luminiscente a  $\sim 600 \text{ nm}$  apenas se recogería señal debida a los QDs, y sólo se mediría la señal debida al fluoróforo.

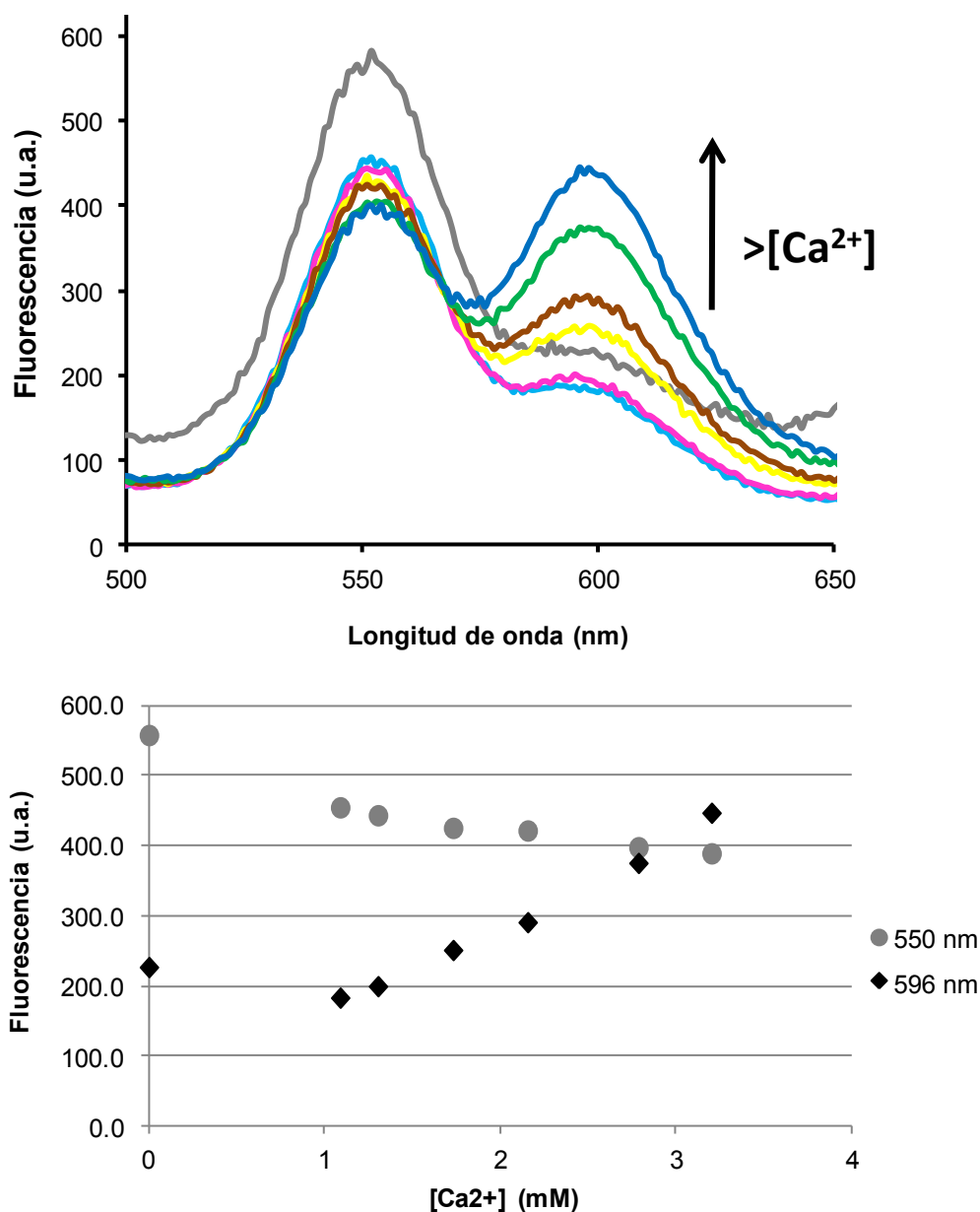
Para alcanzar una mejor separación entre las longitudes de onda de emisión del donador (QDs) y de excitación del aceptor se emplearon QDs de CdSe/ZnS con una emisión más baja en torno a los 570 nm.



**Figura 69.** Solapamiento entre el espectro de excitación del indicador fluorescente sensible al calcio (Aceptor) y el espectro de emisión de los QDs comerciales (Donador).

Se prepararon en este caso disoluciones con una concentración de QDs de 0,06  $\mu\text{M}$  y porcentajes de X-Rhod-1 de 0,05 % y 0,1 % respecto a la cantidad de monómeros de polímero. Las sondas de calcio se prepararon siguiendo el mismo procedimiento que en los casos anteriores (Ver D.4.2.1), además del mismo protocolo de solubilización en medio acuoso con agua MQ y NaOH, y posterior dilución una disolución reguladora MOPS-KCl purificada con Chelex. Se observó en ambos casos una variación de la señal del indicador de calcio a su longitud de onda de excitación óptima (570 nm), pero cuando la sonda indicadora se excitaba a la longitud de onda de excitación de los QDs (350 nm) este cambio no era apreciable.

El siguiente paso que se dio consistió en emplear una disolución reguladora completamente libre de calcio disponible comercialmente con una composición 10 mM de EGTA (Ácido etilenglicol-bis( $\beta$ -aminoetil éter)- N, N, N', tetraacético)-30 mM MOPS de pH 7,2. Como se puede ver en la Figura 70, con esta disolución reguladora se observó una reducción de la señal de luminiscencia de los QDs a 565 nm con concentraciones crecientes de calcio en el medio, y de forma simultánea, un incremento en la señal del indicador fluorescente del calcio a 596 nm a la longitud de onda de excitación del QD (350 nm).



**Figura 70.** Respuesta del sistema (QDs-A)-P donde A = X-Rhod-1 a concentraciones crecientes de calcio en el medio. Condiciones de medida  $\lambda_{ex} = 350 \text{ nm}$ ; Rendijas 20/20 nm; Voltaje 650 v

Los resultados obtenidos nos permiten afirmar que se ha llevado a cabo la síntesis y caracterización de un sistema basado en medidas de fluorescencia con transferencia de energía, con el fin de desarrollar un nanosensor para la detección de calcio mediante el empleo de nanopartículas luminiscentes que actúan como donadores, recubiertas con un polímero que posee incorporado en su estructura la molécula aceptora.

Así pues, la estrategia de incorporación de una molécula luminiscente sensible al calcio (aceptor) de forma sencilla por adsorción en la estructura polimérica utilizada

durante la solubilización de QDs (actuando como donadores de energía), ha permitido el desarrollo de un sistema FRET en donde se asegura una cercanía del aceptor al entorno del donador. El empleo de QDs (cuya luminiscencia puede ser modulada simplemente modificando su tamaño), permite asegurar un alto grado de solapamiento con el espectro de excitación del aceptor, y además se consigue buena estabilidad en medios salinos gracias a la funcionalización con el polímero anfifílico.

Los estudios realizados demuestran que el proceso de transferencia de energía tiene lugar. Hay que mencionar que la geometría de conjugación aceptor-donador propuesta posee varias ventajas. En primer lugar, todas las moléculas de aceptor empleadas se incorporan dentro del recubrimiento polimérico. Por otro lado, es posible incorporar moléculas aceptoras hidrófobas (mientras que para incorporarlas a la parte externa deben ser solubles en medios acuosos) y finalmente, se evitan problemas relacionados con la estabilidad coloidal.

Por todo esto, desde un punto de vista práctico, la inclusión de la molécula aceptor dentro de la estructura del polímero anfifílico facilita el manejo de los conjugados, y permite una mayor estabilidad a largo plazo, requisito indispensable a la hora de diseñar un sensor basado en FRET con nanopartículas.

#### D.4.3 Referencias

- <sup>1</sup> J. M. Costa-Fernández, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, **The use of luminescent quantum dots for optical sensing**. Trends in Analytical Chemistry, 2006, 25, 3, 207-218.
- <sup>2</sup> W. R. Algar, U. J. Krull, **Quantum dots as donors in fluorescence resonance energy transfer for the bioanalysis of nucleic acids, proteins, and other biological molecules**. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2008, 391, 1609-1618.
- <sup>3</sup> W. R. Algar, A. J. Tavares, U. J. Krull, **Beyond labels: a review of the application of quantum dots as integrated components of assays, bioprobes, and biosensors utilizing optical transduction**. Analytica Chimica Acta, 2010, 673, 1-25.
- <sup>4</sup> R. Gill, M. Zayats, I. Willner, **Semiconductor Quantum Dots for Bioanalysis**. Angewandte Chemie International Edition, 2008, 47, 7602-7625.
- <sup>5</sup> J. M. Klostranec, W. C. W. Chan, **Quantum dots in biological and biomedical research: Recent progress and present challenges**. Advanced Materials, 2008, 18, 1953-1964.

- <sup>6</sup> K. Boldt, O. T. Bruns, N. Gaponik, A. Eychmüller, **Comparative examination of the stability of semiconductor quantum dots in various biochemical buffers**. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2006, 110, 1959-1963.
- <sup>7</sup> B. Dubertret, P. Skourides, D. J. Norris, V. Noireaux, A. H. Brivanlou, A. Libchaber, **In vivo imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles**. *Science*, 2002, 298, 1759-1762.
- <sup>8</sup> W. J. Parak, D. Gerion, D. Zanchet, A. S. Woerz, T. Pellegrino, C. Micheel, S. C. Williams, M. Seitz, R. E. Bruehl, Z. Bryant, C. Bustamante, C. R. Bertozzi, A. P. Alivisatos, **Conjugation of DNA to silanized colloidal semiconductor nanocrystalline quantum dots**. *Chemistry of Materials*, 2002, 14, 2113-2119.
- <sup>9</sup> A. Takahashi, P. Camacho, J. D. Lechleiter, B. Herman, **Measurement of Intracellular Calcium**. *Physiological Reviews*, 1999, 79, 4, 1089-1125.
- <sup>10</sup> O. S. Wolfbeis, **Fiber-optic chemical sensors and biosensors**. *Analytical Chemistry*, 2004, 76, 3269-3284.
- <sup>11</sup> D. J. Aberasturi, J. M. Montenegro, I. R. Larramendi, T. Rojo, T. A. Klar, R. Alvarez-Puebla, L. M. Liz-Marzán, W. J. Parak, **Optical sensing of small ions with colloidal nanoparticles**. *Chemistry of Materials*, 2012, 24, 738-745.
- <sup>12</sup> X. Wang, C. Boschetti, M. J. Ruedas-Rama, A. Tunnacliffe, E. A. H. Hall, **Ratiometric pH-dot ANSors**. *Analyst*, 2010, 135, 1585-1591.
- <sup>13</sup> M. Dahan, T. Laurence, F. Pinaud, D. S. Chemla, A. P. Alivisatos, M. Sauer, S. Weiss, **Time-gated biological imaging by use of colloidal quantum dots**. *Optics Letters*, 2001, 26, 11, 825-827.
- <sup>14</sup> F. Zheng, Z. Ali, F. Amin, A. Feltz, M. Oheim, W. J. Parak, **Ion and pH sensing with colloidal nanoparticles: influence of surface charge on sensing and colloidal properties**. *The European Journal of Chemical Physics Physical Chemistry*, 2010, 11, 730-735.
- <sup>15</sup> A. Riedinger, F. Zhang, F. Dommershausen, C. Röcker, S. Brandholt, G. U. Nienhaus, U. Koert, W. J. Parak, **Ratiometric-optical sensing of chloride ions with organic fluorophore-gold nanoparticles hybrids: A systematic study of design parameters and surface charge effects**. *Small*, 2010, 6, 22, 2590-2597.
- <sup>16</sup> W. E. Morf, K. Seiler, B. Rusterholz, W. Simon, **Design of a calcium-selective optode membrane based on neutral ionophores**. *Analytical Chemistry*, 1990, 62, 730-742.
- <sup>17</sup> Y. Qin, S. Peper, A. Radu, A. Ceresa, E. Bakker, **Plasticizer-free polymer containing a covalently immobilized Ca<sup>2+</sup>-selective ionophore for potentiometric and optical sensors**. *Analytical Chemistry*, 2003, 75, 3038-3045.

- <sup>18</sup> O. S. Wolfbeis, **Fluorescence-based ion sensing using potential-sensitive dyes**. *Sensors and Actuators B*, 1995, 29, 140-147.
- <sup>19</sup> R. Y. Tsien, **New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: Design, synthesis, and properties of prototype structures?** *Biochemistry*, 1980, 19, 2396-2404.
- <sup>20</sup> T. Rosatzin, P. Holy, K. Seiler, B. Rusterholz, W. Simon, **Immobilization of components in polymer membrane-based calcium selective bulk optodes**. *Analytical Chemistry*, 1992, 64, 2029-2035.
- <sup>21</sup> R. M. Paredes, J. C. Etzler, L. T. Watts, W. Zheng, J. D. Lechleiter, **Chemical calcium indicators**. *Methods*, 2008, 46, 143-151.
- <sup>22</sup> C. M. Kinoshita, S. C. Ying, T. E. Hugli, J. N. Siegel, L. A. Potempa, H. Jiang, R. A. Houghten, H. Gewurz, **Elucidation of a protease-sensitive site involved in the binding of calcium to C-reactive protein?** *Biochemistry*, 1989, 28, 9840-9848.
- <sup>23</sup> N. M. Thielens, A. Van Dorselaers, J. Gagnon, G. J. Aralaud, **Chemical and functional characterization of a fragment of Cis containing the epidermal growth factor homology region**. *Biochemistry*, 1990, 29, 3570-3578.



## **E.CONCLUSIONES/CONCLUSIONS**





Las principales conclusiones derivadas de la presente Tesis Doctoral pueden resumirse en los siguientes puntos:

1. Se ha evaluado comparativamente el comportamiento coloidal de distintos QDs fotoluminiscentes con núcleo de CdSe y de CdSe/ZnS con diferente recubrimiento superficial. Se ha observado que la luminiscencia de los QDs está seriamente afectada por el pH del medio, aunque esta influencia es menor en el caso de las nanopartículas modificadas por intercambio de ligandos. Sin embargo, si evaluamos la estabilidad a largo plazo, los QDs que se han estabilizado mediante el empleo de un recubrimiento polimérico anfifílico presentan menores problemas de agregación y una mayor estabilidad coloidal. Además, se ha observado que la modificación del entorno que rodea el núcleo de la nanopartícula en los diversos procesos de modificación influye sobre los rendimientos cuánticos de la fluorescencia y los valores de tiempo de vida.

Por otro lado, el empleo de la metodología AF4-MALS ha permitido obtener una estimación del radio hidrodinámico  $r_h$  de los QDs de núcleo CdSe/ZnS recubiertos con un polímero anfifílico, y por extensión una estimación del espesor de la capa de recubrimiento polimérico. Además dicha metodología ha permitido detectar la presencia de agregados y de componentes no enlazados a la nanopartícula sin alterar la propia naturaleza de la nanopartícula.

2. Con objeto de elucidar y controlar el proceso de fotoactivación de los QDs de CdSe/ZnS se estudió en profundidad dicho fenómeno. Se ha comprobado que el proceso de fotoactivación depende de la propia composición de los QDs, tanto del núcleo como de los ligandos que lo rodean. Además podemos concluir que la oxidación del núcleo del QD parece ser el proceso dominante durante la fotoactivación, tal y como se demuestra por la reducción del tamaño del núcleo de forma paralela al incremento de la concentración de metales libres en disolución. Asimismo, los QDs dotados de un recubrimiento polimérico favorecen la formación de radicales hidroxilo en el medio lo que propicia la degradación de las nanopartículas. El ajuste de los datos experimentales a una ecuación matemática simplifica y facilita el estudio de los comportamientos entre muestras y entre distintos tipos de nanopartículas gracias a la conversión de las simples medidas de intensidad de fluorescencia en factores como el parámetro de ajuste o velocidades de fotoactivación.

3. Se ha propuesto un procedimiento sencillo y general para la inmovilización de QDs de CdSe/ZnS recubiertos con una capa polimérica en la estructura de un sol-gel inorgánico permaneciendo las características luminiscentes del nanocrystal inalteradas, además de presentar una elevada estabilidad y robustez. Además, la co-inmovilización de un colorante (indicador sensible al pH) que actúa como aceptor durante el proceso de polimerización del soporte sol-gel conjuntamente con los QDs (donador) en la estructura final, ha demostrado la viabilidad del desarrollo de sensores basados en un proceso de transferencia de energía (FRET) mediante un enfoque sencillo.

4. Se ha llevado a cabo la inmovilización de QDs de CdSe/ZnS en una matriz inorgánica sol-gel para llevar a cabo el desarrollo y caracterización de una nueva fase sensora luminiscente para la identificación y detección de vapores orgánicos.

Ha sido preciso llevar a cabo distintas modificaciones en la composición de la matriz sólida en la que se atrapan a los QDs coloidales, dando lugar a dos fases sensoras distintas que se han empleado en el desarrollo de un método de análisis que ha demostrado poseer una selectividad parcial hacia la exposición a los diversos compuestos volátiles. Así, mediante el empleo de herramientas del ámbito de la Quimiometría (necesarias para llevar a cabo el procesado y análisis de las señales de emisión fluorescente de dos fases sensoras distintas tras su exposición a mezclas gaseosas contaminadas con vapores orgánicos) ha sido posible llevar a cabo el desarrollo de una metodología sencilla que permite la identificación individual y la discriminación de distintas especies gaseosas en una muestra compleja.

5. Se han realizado estudios dirigidos al empleo de quantum dots como indicadores luminiscentes conjugados a receptores apropiados capaces de reconocer al analito. Para ello, se ha diseñado un sistema basado en mecanismos de transferencia de energía, con una geometría que asegura una mínima distancia entre el donador y el aceptor, de manera que se comprobó que se produce transferencia de energía.

Desde un punto de vista práctico, la inclusión de la molécula aceptora dentro de la estructura del polímero anfífilico facilita el manejo de los conjugados, y permite una mayor estabilidad a largo plazo, requisito indispensable a la hora de diseñar un sensor basado en FRET con nanopartículas. Además, este sistema fue evaluado para llevar a cabo el desarrollo de una metodología analítica para la determinación de iones Calcio a niveles de traza.

The main conclusions that could be extracted from the present Ph. D. Thesis can be summarized through the following stages:

1. A comparative evaluation of the colloidal behavior of distinct CdSe and CdSe/ZnS luminescent QDs modified with different ligands was carried out. It can be observed that QDs luminescence is significantly affected by the pH medium, although this influence is lower than in the case of nanoparticles modified via ligand exchange. However, in the evaluation of long-term stability QDs modified via amphiphilic polymer show less aggregation problems, and better colloidal stability. Moreover, it has been observed that the modification of nanoparticles local environment during the modification procedures have an influence on QDs fluorescence quantum yields and fluorescence lifetimes.

On the other hand, the use of AF4-MALS methodology has provided an estimated hydrodynamic radius  $r_h$  for luminescent CdSe/ZnS QDs modified via amphiphilic polymer, therefore it has been also obtained an approximate thickness value for the polymeric shell. Besides, this methodology have made possible to detect the presence of aggregates or unbounded components without modifying the original nanoparticles.

2. In order to clarify and control the QDs CdSe/ZnS photoactivation, this process was studied deeply. It has been proved that the photoactivation process depends on both QDs core composition and the type of ligands which stabilize the nanocrystalline semiconductor. Furthermore, the QDs core oxidation seems to be the main process responsible of photoactivation, as it has been proved by the reduction in the core size in line with the increase in the free metal concentration in solution. Also, QDs modified via amphiphilic polymer favored the formation of hydroxyl radicals in the media, bringing out the nanoparticles degradation. The adjustment of the experimental data by mathematical equation simplifies and makes easier the study of the different behavior between samples and distinct types of nanoparticles due to the conversion fluorescence measurement into factors like stretching parameter or photoactivation rates.

3. A general and simple procedure for the immobilization of polymeric CdSe/ZnS QDs inside an inorganic sol-gel has been proposed while remaining their nanocrystal luminescent properties unaltered, besides they show a high stability and

robustness. Moreover, the co-immobilization of an acceptor (pH sensitive dye) in the final structure has proved the viability in the sensors development based on the energy transfer process (FRET) through a simple perspective.

4. It has been carried out the immobilization of CdSe/ZnS QD in an inorganic sol-gel matrix in order to develop and to characterize a new luminescent sensing phase for the identification and detection of organic vapors. It was necessary to carry out different modifications in the matrix composition, resulting in two different sensing phases, which have been employed in the development of a new method of analysis. The developed method shows partial selectivity towards exposure to various volatile compounds. Thus, by means of the use of Chemometrics (they are necessary for the analysis of the luminescent emission signals from the two different sensing phases after their exposition to gaseous mixtures containing organic vapors) was possible to develop a simple methodology allowing their individual identification and discrimination between different gaseous species in complex mixtures.

5. Some studies were carried out in order to employ quantum dots bounded to the appropriate receptors as luminescent labels allowing the analyte recognition. For this purpose, it has been designed a system based on energy transfer mechanisms, whose geometry ensures a minimum distance between donor and acceptor, so that it was proven that energy transfer occurs. From a practical point of view, the inclusion of an acceptor molecule inside the amphiphilic polymeric shell facilitates the using of the final conjugates obtained, and it provides better long term stability, a requirement in the design of a nanoparticles sensor based on FRET. Furthermore, this system was evaluated for the development of an analytical methodology to the determination of calcium ions at trace levels.

**F.SUGERENCIAS PARA TRABAJOS  
FUTUROS**



A partir de los resultados obtenidos a lo largo de esta Tesis Doctoral y considerando las conclusiones expuestas anteriormente, es posible sugerir alguna línea de investigación futura, entre las que destacamos las siguientes:

**1. Empleo de nuevas modificaciones superficiales de los QDs para la mejora del proceso inmovilización de un aceptor en el entorno del núcleo del QDs incrementando la eficiencia del proceso de FRET.** Partiendo de las conclusiones obtenidas en el desarrollo de un sistema sensor de calcio, se propone llevar a cabo el desarrollo de nuevas modificaciones superficiales de los quantum dots para mejorar la eficiencia del proceso de FRET. A lo largo de la tesis hemos podido comprobar que la modificación superficial con un polímero anfifílico es la más adecuada para la mayoría de las aplicaciones, aunque no está exenta de complicaciones (la mayor parte de ellas derivadas de su limitada estabilidad). Se prevé que sería posible aumentar la estabilidad del conjugado a través de la formación de una unión covalente del aceptor a los ligandos que rodean la nanopartícula. Por otro lado, con el fin de mejorar la accesibilidad del analito a la superficie de la nanopartículas (y con ello la sensibilidad de la determinación) se propone emplear moléculas de PEG de diferente longitud para optimizar la distancia del aceptor a la superficie de la nanopartícula o donador.

**2. Uso de la técnica de separación AF4 para el estudio de la pureza y estabilidad de conjugados de los QDs con diversas biomoléculas (proteínas o anticuerpos).** Es cada vez más importante prestar gran atención a los métodos de caracterización y purificación de materiales biocompuestos elaborados a partir de nanomateriales para poder alcanzar un comportamiento reproducible y controlado de la nanoestructura final sintetizada. Una caracterización adecuada es también esencial en el campo de la nanotoxicología, y a corto plazo será crítica en cualquier área de investigación o bien a la hora de comercializar cualquier tipo de nanomaterial para asegurar una reproducibilidad en la síntesis, calidad del producto, su efectividad y su seguridad. La técnica de AF4 ha demostrado su potencial como herramienta de análisis de la calidad de las nanopartículas solubilizadas en medios acuosos, como ya hemos visto en esta Tesis Doctoral, pero además ha demostrado su potencial en la purificación del nanomaterial bioconjugados de aquella parte del nanomaterial que no lo está bioenlazado o bien del exceso de biomoléculas libres. Se plantea también el uso de esta técnica para continuar con los estudios de caracterización de los QDs-P, en cuanto a la estabilidad con el tiempo y en diferentes medios acuosos.



**3. Empleo de los QDs para estudios de cambios conformacionales por medio de medidas de FRET medida de la actividad de proteasas.** Los procesos FRET han demostrado ser especialmente adecuados para el diseño de sistemas indicadores basados en cambios en la distancia donador-aceptor inducidos por el analito. Esta estrategia podría emplearse como plataforma para la detección de la actividad de proteasas. Las proteasas son un importante grupo de enzimas con un papel esencial en numerosos procesos biológicos. La configuración propuesta se basará en la incorporación de varias copias de péptidos marcados con un colorante (aceptor) en las proximidades de la nanopartícula. Una vez que el acepto se encuentra en las proximidades del donador induce el *quenching* de la luminiscencia del donador, en este caso los QDs. Una vez formado el sistema QD-peptido-aceptor, si el sistema se pone en contacto con una muestra donde esté presente la enzima tendrá lugar la ruptura del péptido, liberándose de esta forma el acepto y por tanto alejándose de la superficie de la nanopartícula lo que finalmente se traduce en una reducción del proceso de FRET de forma paralela al incremento de la luminiscencia de la nanopartícula.

**4. Estudio de los efectos sobre células de los QDs para evaluar su potencial toxicidad en muestras biológicas como marcadores luminiscentes.** Durante la última década los QDs han atraído la atención de numerosos investigadores como biomarcadores fluorescentes alternativos a los colorantes orgánicos tradicionales por sus excelentes propiedades. Sin embargo, consecuencia de sus reducidas dimensiones y su propia composición química, su uso como marcadores a nivel celular o en aplicaciones *in vivo* puede llegar a ser tóxico. Para poder desarrollar aplicaciones de *imaging* a nivel celular o *in vivo* es necesario seleccionar QDs de baja toxicidad. Existe una gran controversia entre los investigadores acerca de la potencial toxicidad de las nanopartículas tanto para organismos vivos como para el medio ambiente. Se plantea realizar estudios *in vitro* con QDs de distinta naturaleza solubles en medios acuosos incorporando el nanomaterial al medio de crecimiento celular. Tras el proceso de incubación se pretende evaluar la distribución y localización de los QDs dentro de la propia célula, y comparar, tras diferentes tiempos de exposición al nanomaterial, los efectos inducidos en la célula por medio de parámetros como la viabilidad celular, la morfología, la funcionalidad y genotoxicidad celular.

**5. Empleo de nuevos soportes sólidos tipo sol-gel para inmovilizar QDs junto con biomoléculas para el desarrollo de nuevas fases sensoras.** En la presente Tesis hemos desarrollado un procedimiento sencillo y general para la inmovilización de

QDs-P en la estructura de un sol-gel inorgánico de forma que sus propiedades luminiscentes permanezcan inalteradas. Además hemos demostrado las posibilidades de dicho soporte para el desarrollo de un sensor basado en un proceso de transferencia de energía, y para el desarrollo de un material para la detección de compuestos orgánicos volátiles. La química de los sol-geles ofrece también novedosas e interesantes posibilidades para la encapsulación de moléculas delicadas (enzimas, proteínas, anticuerpos, células o microbios). Una de las ventajas que ofrece este tipo de soporte para la inmovilización de biomoléculas es que puede llegar retener una gran cantidad de agua (lo que puede proporcionar estabilidad a largo plazo a las biomoléculas), y además el proceso puede tener lugar a temperatura ambiente. Debemos tener presente que la funcionalidad de las moléculas inmovilizadas no se vea afectada por dicho proceso. Puede ser necesario ampliar la variedad de materiales, además de los sol-geles inorgánicos, se puede trabajar con otras variedades de materiales sol-gel cuyas características son más adecuadas para las biomoléculas.



**G. ANEXO: RELACIÓN PUBLICACIONES  
CIENTÍFICAS DERIVADAS DEL TRABAJO  
RECOGIDO EN LA MEMORIA DE LA TESIS  
DOCTORAL**



**G.1 ENTRAPMENT OF QUANTUM DOTS IN SOL-GEL  
MATRICES TO DEVELOP SENSING MATERIAL BASED  
ON FLUORESCENCE RESONANCE ENERGY TRANSFER**

A. M. Coto-García, M. T. Fernández-Argüelles, J. M. Costa-  
Fernández, A. Sanz-Medel.

Chemical Communications 36 (2009), 5454-5456



# Entrapment of quantum dots in sol–gel matrices to develop sensing material based on fluorescence resonance energy transfer†

A. M. Coto-García, M. T. Fernández-Argüelles, J. M. Costa-Fernández and A. Sanz-Medel\*

Received (in Cambridge, UK) 15th May 2009, Accepted 16th July 2009

First published as an Advance Article on the web 29th July 2009

DOI: 10.1039/b909469e

**A simple and general procedure is described for the development of fluorescence resonance energy transfer (FRET) systems by the co-immobilization in a sol–gel matrix of photoluminescent quantum dots with a given dye “acceptor”.**

Luminescent semiconductor nanocrystals, also known as quantum dots (QDs), are a new generation of fluorophores with exceptional optical features. These nanoparticles exhibit a broad excitation spectra coupled with a narrow size-tunable luminescence emission, high brightness and good photostability.<sup>1,2</sup> Actually, QDs have shown great potential for the development of innovative fluorescence resonance energy transfer (FRET) assays. QDs are excellent FRET donors because they can overcome many of the limitations described for conventional organic dyes, used as donor agents, in FRET-based systems.<sup>3</sup> FRET processes involve the non-radiative transfer of excitation energy from an excited donor fluorophore, to a ground-state acceptor. This phenomenon is driven by dipole–dipole interactions and depends on the degree of spectral overlap between donor photoluminescence and acceptor absorption and on the sixth power of the separation distance between the donor and acceptor pair.<sup>4</sup> The symmetric, narrow and size-tunable emission of QDs minimizes donor emission leakage into the acceptor wavelength detection enabling improved spectral overlap between the donor emission and the acceptor excitation.<sup>5</sup> Several QD-FRET systems have been developed for studying the structure and dynamics of macromolecules<sup>1,6</sup> and for chemical sensing, by measuring changes in the FRET efficiency.<sup>7</sup>

A step further towards the development of QD-based sensing materials requires immobilizing the nanoparticles in appropriate solid supports to fabricate “active” solid phases.<sup>8</sup> In this sense, sol–gel technology could offer an excellent approach for appropriate QD immobilization in terms of the simplicity of sol–gel preparation, chemical inertness, tunable porosity, optical transparency, mechanical stability and negligible swelling behaviour.<sup>9</sup> In fact, sol–gel technology has recently started to be used in the incorporation of colloidal semiconductor nanocrystals into a structured matrix.<sup>10,11</sup>

In this vein, here we investigated a very simple and general procedure for the immobilization of CdSe/ZnS QDs, synthesized in our lab, inside a sol–gel solid support, while

maintaining the advantageous optical properties of the colloidal nanoparticles. In addition, the conditions required to attain efficient FRET from the entrapped fluorescent QDs (acting as donors) to appropriate dyes (acceptors) co-immobilized in the inorganic matrix have been investigated. The co-immobilization of the acceptor dye and the QDs inside the inorganic structure during the polymerization process would favour a higher efficiency of the energy transfer process (from the entrapped QDs to the dye, due to both the closer proximity of the donor and acceptor in the randomly mixed close packed sol–gels and the possibility of including several acceptor dye molecules per QD).

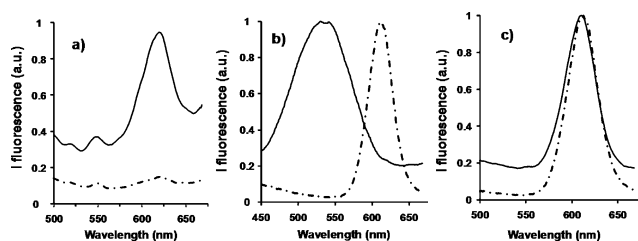
First of all, ZnS/CdSe QDs have been synthesized in our lab (see note § in ESI†), and then, several approaches have been evaluated to get QD-doped sol–gel materials maintaining the favourable spectroscopic characteristics of the QDs dispersed in solution. Based on previous studies carried out in our laboratory,<sup>12</sup> sol–gels were firstly prepared by using as precursor different ratios of tetramethoxysilane (TMOS) and methyltrimethoxysilane (MTMOS), in ethanol–water media and with NaOH as catalyzer of the polymerization (see note Φ in ESI†). Appropriate amounts of colloidal suspensions of freshly-prepared QDs were incorporated along with the precursors in the mixture of precursors. For such doped sol–gel material preparation, different QDs were evaluated: QDs without any surface modification which are soluble in chloroform, water-soluble QDs coated with mercaptoethane-sulfonic acid (MES), and water-soluble QDs whose surface was coated with an amphiphilic polymer (PQDs), that were all synthesized and surface-modified in our lab (see notes † and ‡ in ESI†). After polymerization, all the doped sol–gels were exposed during 6 hours to a 4 W UV lamp (365 nm) for QD photoactivation,<sup>13</sup> and then, the performances of the resulting luminescent materials was evaluated and critically compared in terms of spectral characteristics, stability of the luminescence and homogeneity of the obtained final solid matrix.

It was observed that for QDs without any surface modification (soluble in chloroform) the doped sol–gel material emitted fluorescence with the same wavelength maximum as that of the corresponding colloidal QDs dispersed in chloroform. However, the resulting sol–gel matrix was heterogeneous and its luminescence was extinguished after exposure to a flow of water. A lixiviation of the nanoparticles from the sol–gel matrix was apparent, probably due to the absence of a protective hydrophilic shell around the surface of the QDs (see Fig. 1a). Therefore surface-protected water-soluble QDs were then evaluated for preparation of the doped sol–gel material using two different water-solubilization approaches: firstly an exchange of the hydrophobic TOPO surfactant

Department of Physical and Analytical Chemistry,  
University of Oviedo, Julián Clavería, 8, 33006 Oviedo, Spain.  
E-mail: asm@uniovi.es; Fax: +34 985 10 31 25;  
Tel: +34 985 10 34 74

† Electronic supplementary information (ESI) available: Procedures, experimental data, Fig. S1, Fig. S2, Table S1 and Table S2. See DOI: 10.1039/b909469e





**Fig. 1** Emission spectra of: (a) chloroform-soluble QDs (solid-line) and QDs trapped in a sol-gel after being exposed to a flow of water (dotted line); (b) water-soluble PQDs (dotted line) and QDs incorporated inside the sol-gel matrix (solid line); (c) water-soluble PQDs (dotted line) and PQDs incorporated into the sol-gel *via* APTES addition (solid line).

molecules (adsorbed on the surface of the originally synthesized QDs) with bifunctional molecules having a hydrophilic group (binding ZnS with the other end of the molecule such as the thiols (–SH) of MES).<sup>14</sup> Once the QDs were surface-modified, remaining stable in aqueous buffer at pH 12, they were trapped inside the porous sol-gel. After photoactivation of such QDs trapped inside the sol-gel material, intense luminescence emission was observed. However, the presence of big aggregates of nanoparticles was observed in the resulting solid heterogeneous matrix, with an extensive broadening of the QDs emission spectra. Therefore, the use of a coating with an amphiphilic polymer<sup>15</sup> for a more convenient water-solubilization was evaluated. In this latter approach, non-specific interactions between the hydrophobic tails of the coating polymer and the hydrophobic surfactant molecules on the nanocrystal surface are able to generate an additional coating which provides solubility to the nanoparticles in aqueous media.<sup>15</sup> Thus, after the synthesis of the surface-modified QDs (with an amphiphilic polymer, as described elsewhere<sup>16,17</sup>) the corresponding doped sol-gels were prepared and their spectroscopic characteristics investigated. The visual aspect of these latter doped sol-gels was highly homogeneous. However, a blue shift of the emission wavelength from the trapped QDs, as compared to the emission of the corresponding colloidal polymer-coated QDs dispersed in aqueous buffer, was observed (Fig. 1b).

This blue shift can be attributed to the interactions of the nanoparticles with the porous solid matrix. Moreover, the obtained sol-gels exhibited high luminescence in both air and flowing water. Unfortunately, a significant decrease of the fluorescence emission with time was observed, and attributed to a lixiviation process of the QDs from the sol-gel (probably as a result of modifications of the synthesized sol-gel structure, due to solvation, when the sol-gel is in contact with water for relatively long periods of time). In order to overcome such observed drawbacks, different sol-gel precursors were evaluated. In this vein, the use of a precursor with an amino functional group, which might reduce the lixiviation of the polymer-coated QDs due to the generation of a covalent bond between the amino groups from the precursors and the carboxylic functional groups from the polymer coating of the nanoparticles, was investigated (see note  $\Delta$  in the ESI<sup>†</sup>). For this purpose, different ratios of TMOS and (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES) (85–20%), varying from 15 : 80 to

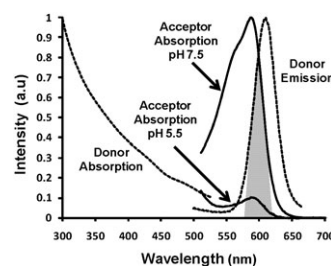
80 : 20 TMOS–APTES, and an excess of EDC (*N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethyl-carbodiimide hydrochloride) were used for the synthesis of the sol-gels. Here, the addition order of the reagents to the precursor mixture played a significant role. To obtain homogeneous sol-gels, with optimum spectroscopic characteristics, EtOH, PQDs, APTES, EDC, TMOS and NaOH were added in this order, under constant stirring. As shown in Fig. 1c, sol-gels prepared under such experimental conditions emit strong luminescence without broadening of the emission spectra or an emission wavelength shift, as compared to the spectra of the corresponding PQDs in water media. Moreover, no significant decrease of the measured fluorescence with time was observed when such a sol-gel was exposed to a flow of water (this favourable feature can be attributed to the absence of lixiviation of the QDs from the sol-gel). That is, the covalent trapping of the nanoparticles inside the solid matrix seems to have been effective.

Once the synthesis of optically and physically stable sol-gels doped with QDs was secured, the co-immobilization of a water-soluble dye was attempted to develop FRET-based sensors (see note  $\Psi$  in the ESI<sup>†</sup>). As a “proof of concept”, pH was selected as the model analyte. Thus, a pH sensitive dye, bromocresol purple (BCP) whose absorption spectra is known to be modified by pH in the range between 5.2 and 7.8, was chosen.<sup>18</sup> As can be seen in Fig. 2, the absorption spectra of this dye (between 500 and 650 nm) changed when the pH was changed from 5.5 to 7.5. Therefore, QDs emitting in this region should be employed to achieve a good spectral overlap, making the energy transfer process effective. Thus, CdSe/ZnS QDs with an emission wavelength at 600 nm were chosen as potential donors.

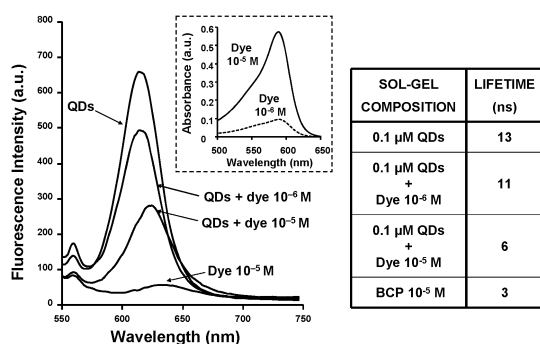
The selected acceptor dye, BCP, was incorporated into the aqueous phase in the sol-gel precursor mixture, to allow for a co-immobilization of the QDs with the dye in the sol-gel matrix. If successful, the sought FRET-based pH chemosensing material would be obtained.

Previous studies demonstrated that sol-gels containing only QDs are not affected by changes in pH of the medium (see Fig. S1, ESI<sup>†</sup>). Thus, any changes in the luminescence with changing pH when the obtained sensing phase is employed could be attributed to the FRET process. As can be seen in Fig. 3, the luminescence of the QD donor was more efficiently quenched the higher the concentration of co-immobilized acceptor, the FRET efficiencies being 0.26 and 0.65 when the BCP concentrations were  $10^{-6}$  and  $10^{-5}$  M, respectively.

Further experiments using time resolved measurements supported this FRET effect: it is known that energy transfer



**Fig. 2** Spectral overlap between the emission spectrum of the QDs and the absorption spectra of the acceptor dye at two pH values.



**Fig. 3** Effect of increasing concentrations of BCP added to the polymer precursor mixture on the luminescence emission of the resulting doped sol-gel. The inset graph corresponds to absorption spectra of different dye concentrations.

in FRET manifests as a decrease in donor fluorescence intensity and a shortening of its exciton lifetime.<sup>19</sup> Using a picosecond-pulsed laser excitation at 405 nm (900 ps pulse with 100 KHz repetition rate), we measured the fluorescence decay of the QDs (donors) trapped in the sol-gels and co-immobilized with different amounts of the pH-sensitive dye (acceptor). The decay times of PQDs co-immobilized with a dye concentration  $10^{-5}$  M were about 6 ns, whereas a tenfold decrease in the dye concentration ( $10^{-6}$  M) resulted both in a decrease in the FRET extent and increase in the measured decay times (11 ns). As expected, the FRET process offers an alternative pathway for donor relaxation, reducing its lifetime when the dye concentration increases. This observation is in line with the measured normalized emission spectra of these solid supports, as shown in Fig. 3a: the donor emission peak is much smaller when the BCP concentration is increased from  $10^{-6}$  M to  $10^{-5}$  M.

The co-immobilization of the donor QDs with the acceptor dye inside the sol-gel matrix was found to be a very simple and general approach to achieving efficient energy transfer. Thus, fluorescence resonance energy transfer is achieved by ensuring an appropriate co-immobilization of the donor QDs with the analyte-sensitive dye acceptor. The potential application of such a synthesized chemosensor of pH was investigated as a practical pH sensing phase. In order to achieve an analytically useful pH dependent fluorescent signal, both donor and acceptor concentrations were optimized in the QDs + dye co-immobilized sol-gel synthesis (see data in Table S1, ESI<sup>†</sup>). Final selected conditions were  $10^{-5}$  M BCP and 0.1 μM of PQDs.

Under such experimental conditions, the resulting sol-gel material was exposed to several water solutions of different pH. The luminescence emission measurements registered showed, as expected, that for lower pH values of the water samples an increase in the luminescence of the QDs was observed (see Fig. S2 and Table S2, ESI<sup>†</sup>) as a consequence

of the FRET process (a clear decrease in the intensity of the absorption spectrum of the acceptor took place for the same experiments).

In summary, a very simple and general procedure for the immobilization of PQDs (acting as FRET donors) with an appropriate acceptor dye co-immobilized in the structure of an inorganic sol-gel is proposed. With the here-proposed synthetic procedure, the luminescent features of the nanoparticles entrapped in the inorganic matrix remain unaltered and exhibited high stability and robustness. Furthermore, our experiments indicate that the co-immobilization of an acceptor dye with the QDs in the sol-gel matrix could provide a novel, simple, general and advantageous approach for the future development of a wide variety of FRET-based sol-gel sensors.

This work was supported by the project CTQ2006-02309 (Ministerio de Educación y Ciencia, Spain). Financial support to A. M. Coto-García provided by the Ministry of Science and Innovation of Spain (FPU grant AP2006-03787), co-financed by the European Social Fund, is gratefully acknowledged.

## Notes and references

- I. L. Medintz, A. R. Clapp, H. Mattoussi, E. R. Goldman, B. Fisher and J. M. Mauro, *Nat. Mater.*, 2003, **2**, 630.
- M. Y. Han, X. H. Gao, J. Z. Su and S. Nie, *Nat. Biotechnol.*, 2001, **19**, 631.
- T. C. Lim, V. J. Bailey, Y. P. Ho and T. H. Wang, *Nanotechnology*, 2008, **9**, 075701.
- A. R. Clapp, I. L. Medintz and H. Mattoussi, *ChemPhysChem*, 2006, **7**, 47.
- K. E. Sapsford, T. Pons, I. L. Medintz and H. Mattoussi, *Sensors*, 2006, **6**, 925.
- S. Hohng and T. Ha, *ChemPhysChem*, 2005, **6**, 956.
- P. T. Snee, R. C. Somers, G. Nair, J. P. Zimmer, M. G. Bawendi and D. G. Nocera, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 13320.
- J. M. Costa-Fernández, R. Pereiro and A. Sanz-Medel, *Trends Anal. Chem.*, 2006, **25**, 207.
- V. B. Kandimalla, V. S. Tripathi and H. X. Ju, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 2006, **36**, 73.
- C. Bullen, P. Mulvaney, C. Sada, M. Ferrari, A. Chiasera and A. Martucci, *J. Mater. Chem.*, 2004, **14**, 1112.
- R. Reisfeld and T. Saraidarov, *Opt. Mater. (Amsterdam)*, 2006, **28**, 64.
- J. M. Costa-Fernández, M. E. Díaz-García and A. Sanz-medel, *Anal. Chim. Acta*, 1998, **360**, 17.
- G. Y. Lan, Y. W. Lin, Y. F. Huang and H. T. Chang, *Langmuir*, 2005, **21**, 728.
- W. C. W. Chan and S. Nie, *Science*, 1998, **281**, 2016.
- T. Pellegrino, L. Manna, S. Kudera, T. Liedl, D. Koktysh, A. L. Rogach, S. Keller, J. Rädler, G. Natile and W. J. Parak, *Nano Lett.*, 2004, **4**, 703.
- M. T. Fernández-Argüelles, A. Yakovlev, R. A. Sperling, C. Luccardini, S. Gaillard, A. Sanz-Medel, J. Mallet, J. Brochon, A. Feltz, M. Oheim and W. J. Parak, *Nano Lett.*, 2007, **7**, 2613.
- C. J. Lin, R. A. Sperling, J. K. Li, T. Yang, P. Li, M. Zanella, W. H. Chang and W. J. Parak, *Small*, 2008, **4**, 334.
- W. J. Jin, J. M. Costa-Fernández and A. Sanz-Medel, *Anal. Chim. Acta*, 2001, **431**, 1.
- E. R. Goldman, I. L. Medintz, J. L. Whitley, A. Hayhurst, A. R. Clapp, H. T. Uyeda, J. R. Deschamps, M. E. Lassman and H. Mattoussi, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 6744.

## SUPPLEMENTARY INFORMATION

### **1. Selection of the concentrations of PQDs and dye co-immobilized in the sol-gel**

Both donor (PQDs) and acceptor (dye) concentrations used in the doped sol-gel synthesis were optimized.

The concentration of the “donor” QDs used in the sol-gel precursors mixture was optimized, preparing different doped sol-gel materials and varying the concentration from 0.01 to 1  $\mu\text{M}$  of PQDs (no dye was used in this experiment). After measuring the fluorescence emission intensities of the resulting matrices, final selected value was 0.1  $\mu\text{M}$  (for such concentration we obtained a stable and analytically useful fluorescence signal in the experimental-instrumental conditions used).

Then, the concentration of the co-immobilized dye (“acceptor”) used in the sol-gel precursors mixture was also optimized. Different sol-gel materials were synthesized by varying the dye concentration and ensuring a 0.1  $\mu\text{M}$  of PQDs in the precursor’s mixture. Fluorescence intensities and FRET efficiencies were measured from the resulting sol-gels (data is collected in Table 1 SI).

**Table 1 SI.** Effect of increasing concentrations of the acceptor (BCP) co-immobilized in the sol-gel matrix on the emission signals of the donor (PQDs) and on the FRET efficiency.

[BCP], mol/L	Fluorescence intensity (a.u.)	FRET efficiency
0	653	0
$10^{-7}$	579	0.11
$10^{-6}$	485	0.26
$10^{-5}$	231	0.65
$10^{-4}$	40	0.94

From data of Table 1 SI, a final selected concentration of  $10^{-5}$  M of the dye (BCP) was finally selected. Lower concentrations of the BCP gave rise to lower FRET efficiencies and poorer sensitivity. Conversely, higher dye concentrations resulted in a very high FRET efficiency not appropriate for further detection of pH changes by fluorescence measurements.

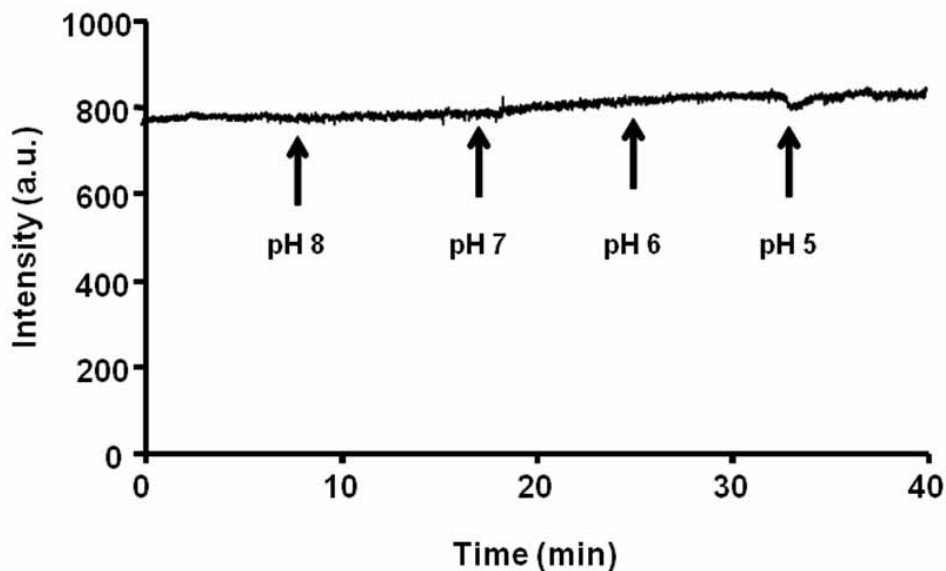
**2. Evaluation of the performance of the sol-gel sensing phase for pH sensing based on FRET measurements**

The resulting sol-gel material (doped with PQDs and BCP) was exposed to several water solutions buffered at different pHs. Luminescence emission measurements registered showed, as expected, that for lower pHs of the water samples an increase on the luminescence of the sol-gel entrapped QDs was observed. Also, the FRET efficiency showed pH dependence (see Table 2 SI).

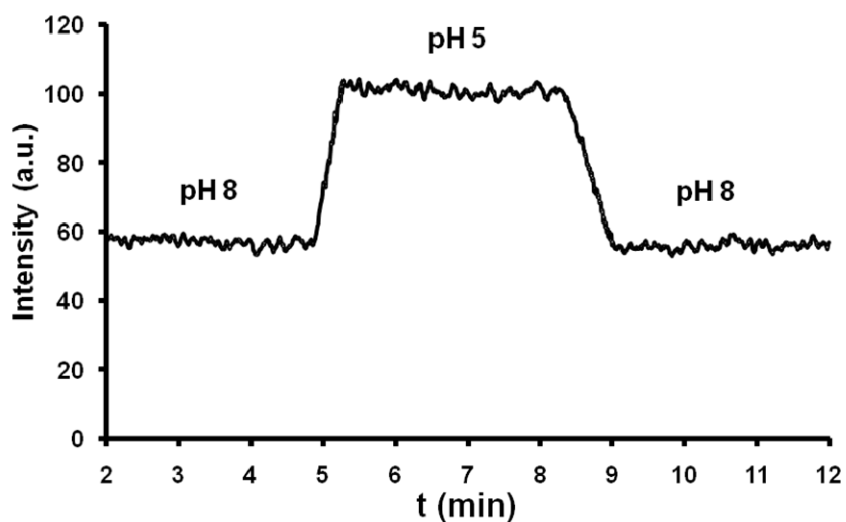
**Table 2 SI.** Effect of variations on the pH of the samples on the luminescence intensities and on the FRET efficiencies measured when employing the pH sensing phase synthesised by co-immobilizing the PQDs with the BCP in a sol-gel matrix.

pH	Fluorescence intensity (a.u.)	FRET efficiency
5	105	0.70
6	81	0.76
6.5	62	0.82
8	55	0.85

## ADDITIONAL FIGURES



**Figure 1 SI.** Effect of changes on the pH of the media on the luminescence emission from doped sol-gel containing only PQDs entrapped in the structure.



**Figure 2 SI.** Decrease of the luminescence emission of the donor as the pH increases.

## **NOTES AND PROCEDURES**

### **(§) Synthesis of CdSe/ZnS QDs**

A selenium stock solution was prepared in an Ar-filled dry-box by dissolving 14.23 mmol of selenium powder in 7.5 mL of TOP, to produce a solution of trioctylphosphine selenide (SeTOP). Zinc sulfide (ZnSTOP) stock solution was also prepared in Ar atmosphere by mixing 1.23 mmol of hexamethyldisilathiane, 1.75 mmol of diethylzinc and 10.25 mL of TOP. CdSe/ZnS QDs were synthesized using CdO as precursor via the procedure described by Peng's group.<sup>S1</sup>

Briefly, 1.23 mmol of CdO, 0.6 g of HPA and 17.5 g of TOPO were loaded into a 250 mL glass three-necked flask. The mixture was heated to 300 °C under argon flow for 15–20 min to allow the complete dissolution of CdO in HPA and TOPO. After cooling the temperature of the solution down to 270 °C, 6 mL of the SeTOP solution were swiftly injected. After injection, nanocrystals were left to grow for about 7 min at 250 °C. Once the growth process has reached the desirable core size, 7.5 mL of ZnS/TOP solution is added slowly at 230 °C in order to allow the generation of the shell, and then is cooled down to 100 °C for an hour. Afterwards, this solution is cooled down to room temperature and the QDs dispersion was transferred to a glass vial and diluted with anhydrous chloroform. Finally, the purification process was done by mixing the QDs solution with methanol, and it was centrifuged at 5000 rpm during 5 min (in order to separate the QDs by precipitation). The supernatant liquid phase was also decanted to remove any excess of reagents. The purified QD nanocrystals were then re-dispersed in anhydrous chloroform.

[S1] Z.A. Peng and X. Peng, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, **123** 183.

### **(Φ) Sol-gel synthesis procedure with TMOS and MTMOS**

2.5 mL of ethanol is mixed with 4 mL of aqueous solutions of QDs (CdSe/ZnS/MES or PQDs) and 50 µL of sodium hydroxide 0.1 M and stirred for 5 minutes. Then 750 µL of TMOS and MTMOS are added and stirred. After homogenization, the polymerization process takes place and the mixture is left to dry for two weeks. The xerogel obtained is grinded in an agate mortar and the fraction between 80 and 180 µm is selected to carry out the experiments. In case of the sol-gel with CdSe/ZnS QDs in chloroform, they are directly mixed with the silicate precursors.

### **(†) Water solubilization via ligand exchange**

For the organic surface modification of the nanoparticles,<sup>S2</sup> 10 mL of CdSe/ZnS QDs in methanol solution containing 1 mL tetrabutylammonium hydroxide and 0.3 g MES to obtain the sulphonic capped nanocrystals. The solution was refluxed for 12 h. After cooling up to room temperature, the modified QDs were then separated and purified as previously described and finally dispersed in pH 12 Sodium Borate Buffer (SBB).

Purification of the CdSe/ZnS/MES QDs was carried out by filtration through a filter device with 0.22  $\mu\text{m}$  pore size.

[S2] W.J. Jin, M.T. Fernández-Argüelles, J.M. Costa-Fernández, R. Pereiro and A.Sanz-Medel, *Chem. Comm.*, 2005, 883.

**(‡) Water solubilization via amphiphilic polymer coating<sup>S3</sup>, and characterization of the resulting nanoparticles**

~2 mL of amphiphilic polymer (PMA75C12) were placed in a round flask with 100 mL of a 2.8  $\mu\text{M}$  solution of CdSe/ZnS quantum dots in anhydrous chloroform and heated to 55-60  $^{\circ}\text{C}$  for approximately 40 s. Afterwards, the mixture was stirred in a rotavap system and the solvent was evaporated slowly. Then, 4 mL of 0.02 M bis(hexamethylene)triamine in chloroform were added to the dried powder, and the mixture was stirred for ~15 min. The solvent was again evaporated and when the mixture was dry, the sample was re-dissolved in pH 12 SBB. Purification of the polymer coated quantum dots was done by filtration through a filter device with 0.22  $\mu\text{m}$  pore size.

The emission spectrum of the resulting colloidal polymer coated QDs (see Figure 1c of the manuscript) shows a narrow emission of fluorescence (fwhm: 38 nm), which indicates that there is a narrow size distribution of the nanoparticles core.

On the other hand, the estimated radio of the core of the QDs used (core of CdSe) was found to be of about 3.9 nm (based on calculations from absorbance and fluorescence data and using the Peng's equations).<sup>S4</sup>

Additionally, particle size distribution analysis of the colloidal polymer coated QDs were performed by asymmetrical flow field-flow fractionation (AF4) with multi-angle light scattering (MALS) detection.<sup>S5</sup> Approximate hydrodynamic size observed by AF4-MALS resulted in hydrodynamic radius ( $r_h$ ) values ranged 9 - 25 nm, with a maximum at ~ 15 nm that indicated the presence of a polymeric shell thickness of ~12 nm. AF4-MALS experiments revealed the possible presence in the sample of a second population with a size ( $r_h = 3 - 10$  nm) lower than the QD size (such non-QD species are likely originated from self-assembling of components used for coating the QDs).<sup>S5</sup>

[S3] M. T. Fernández-Argüelles, A. Yakovlev, R. A. Sperling, C. Luccardini, S. Gaillard, A. Sanz-Medel, J. Mallet, J. Brochon, A. Feltz, M. Oheim and W. J. Parak, *Nano Lett.*, 2007, **7**, 2613.

[S4] W. W. Yu, L. Qu, W. Guo and X. Peng, *Chem. Mater.*, 2003, **15**, 2854.

[S5] A. Zattoni, D. C. Rambaldi, P. Reschiglian, M. Melucci, S. Krol, A.M. Coto-Garcia, A. Sanz-Medel, D. Roessner and C. Johann, *J. Chromatogr. A*, *In Press, Accepted Manuscript*, Available online 18 June 2009.

**(Δ) Sol-gel synthesis procedure with TMOS and APTES:** under constant stirring and in the following order, 2.5 mL of ethanol is mixed with 4 mL of PQDs in aqueous borate buffer pH 12. Then 825  $\mu$ L of APTES is added, followed by the EDC (in a QD:EDC ratio of 1:1000), 675  $\mu$ L of TMOS and 50  $\mu$ L of sodium hydroxide 0.1 M. After homogenization, the polymerization process takes place and the mixture is left to dry for two weeks. The xerogel then obtained is grinded in an agate mortar and the size fraction with diameters between 80 and 180  $\mu$ m was selected for further experiments.

**(Ψ) Synthesis procedure of the sol-gel doped with QDs and the BCP:** under constant stirring and in the following order, 2.5 mL of ethanol is mixed with 500  $\mu$ L of the BCP solution (at the desired concentration), followed by the addition of 200  $\mu$ L of an aqueous solution of PQDs in aqueous borate buffer at pH 12 (in order to achieve a final concentration of PQDs in the final mixture of 0.1  $\mu$ M), 3.3 mL of distilled water and 825  $\mu$ L of APTES. Then, the EDC (in a QD:EDC ratio of 1:1000), 675  $\mu$ L of TMOS and 50  $\mu$ L of sodium hydroxide 0.1 M are added. After homogenization, the polymerization process takes place and the mixture is left to dry for two weeks. The xerogel then obtained is grinded in an agate mortar and the size fraction with diameters between 80 and 180  $\mu$ m was selected for further experiments.





**G.2 ASYMMETRICAL FLOW FIELD-FLOW FRACTIONATION  
WITH MULTI-ANGLE LIGHT SCATTERING DETECTION  
FOR THE ANALYSIS OF STRUCTURED  
NANOPARTICLES**

A. Zattoni, D. C Rambaldi, P. Reschiglian, M. Melucci, S. Krol, A. M. Coto-García, A. Sanz-Medel, D. Roessner; C. Johann

Journal of Chromatography A, 1216 (2009) 9106-9112.





## Asymmetrical flow field-flow fractionation with multi-angle light scattering detection for the analysis of structured nanoparticles

Andrea Zattoni<sup>a,b</sup>, Diana Cristina Rambaldi<sup>a,b</sup>, Pierluigi Reschiglian<sup>a,b,\*</sup>, Manuela Melucci<sup>c</sup>, Silke Krol<sup>d</sup>, Ana Maria Coto Garcia<sup>e</sup>, Alfredo Sanz-Medel<sup>e</sup>, Dierk Roessner<sup>f</sup>, Christoph Johann<sup>f</sup>

<sup>a</sup> Department of Chemistry "G. Ciamician", University of Bologna, via F. Selmi 2, I-40126 Bologna, Italy

<sup>b</sup> Interuniversity Consortium I.N.B.B., Italy

<sup>c</sup> Institute for Organic Synthesis and Photoreactivity-ISOF-CNR, via P. Gobetti 101, I-40129 Bologna, Italy

<sup>d</sup> NanoBioMed Lab @ LANA3DA, CBM – Cluster in Biomedicine, Area Science Park, Basovizza, I-34012 Trieste, Italy

<sup>e</sup> Department of Physical and Analytical Chemistry, University of Oviedo, c/ Julián Clavería, 8, E-33006 Oviedo, Spain

<sup>f</sup> Wyatt Technology Europe GmbH, Hochstrasse 18, D-56307 Dernbach, Germany

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Available online 18 June 2009

#### Keywords:

Asymmetrical flow field-flow fractionation

Multi-angle light scattering

Particle size distribution analysis

Silica nanoparticles

Quantum dots

Gold nanoparticles

### ABSTRACT

Synthesis and applications of new functional nanoparticles are topics of increasing interest in many fields of nanotechnology. Chemical modifications of inorganic nanoparticles are often necessary to improve their features as spectroscopic tracers or chemical sensors, and to increase water solubility and biocompatibility for applications in nano-biotechnology. Analysis and characterization of structured nanoparticles are then key steps for their synthesis optimization and final quality control. Many properties of structured nanoparticles are size-dependent. Particle size distribution analysis then provides fundamental analytical information. Asymmetrical flow field-flow fractionation (AF4) with multi-angle light scattering (MALS) detection is able to size-separate and to characterize nanosized analytes in dispersion. In this work we focus on the central role of AF4-MALS to analyze and characterize different types of structured nanoparticles that are finding increasing applications in nano-biotechnology and nanomedicine: polymer-coated gold nanoparticles, fluorescent silica nanoparticles, and quantum dots. AF4 not only size-fractionated these nanoparticles and measured their hydrodynamic radius ( $r_h$ ) distribution but it also separated them from the unbound, relatively low- $M_w$  components of the nanoparticle structures which were still present in the sample solution. On-line MALS detection on real-time gave the gyration radius ( $r_g$ ) distribution of the fractionated nanoparticles. Additional information on nanoparticle morphology was then obtained from the  $r_h/r_g$  index. Stability of the nanoparticle dispersions was finally investigated. Aggregation of the fluorescent silica nanoparticles was found to depend on the concentration at which they were dispersed. Partial release of the polymeric coating from water-soluble QDs was found when shear stress was induced by increasing flowrates during fractionation.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Design and synthesis of nanoparticles (NPs) with novel physicochemical features are key aspects of current nanotechnology [1,2]. Multifunctional, nanostructured components are finding increasing applications in nano-biotechnology, nanomedicine, nanomaterials, nanoelectronics, and nanosensors/nanodevices [3]. NPs functionalized with chromophores or other reporting molecules are used as sensing elements for new ultrasensitive and selective analytical methods [4]. Application of NPs in nano-

biotechnology for imaging or drug vectorization requires NP surface modification to increase their hydrophilicity and biocompatibility. Conjugated nanostructures are mainly synthesized from silica NPs [5], metal NPs [6], and quantum dots (QDs) [7,8].

Recent indications from institutions such as the US Food and Drug Administration and the European Commission have however focused that major issues in current nano(bio)technologies lie in the lack of homogeneous, pure and well-characterized nanomaterials, also because of the lack of well-assessed, robust, routine methods for quality control analysis and characterization of the nanomaterials. Among different parameters that affect properties of all the nanomaterials, the particle size distribution (PSD) plays a fundamental role. For instance, chemical reactivity of nanomaterials, which is often very different from macro- or microscale materials, is affected by NP surface/volume ratio. Quantum confinement effects make optical, electrical, thermal, and magnetic properties

\* Corresponding author at: Department of Chemistry "G. Ciamician", University of Bologna, via F. Selmi 2, I-40126 Bologna, Italy. Tel.: +39 051 2099564; fax: +39 051 2099456.

E-mail address: [pierluigi.reschiglian@unibo.it](mailto:pierluigi.reschiglian@unibo.it) (P. Reschiglian).

of NPs be size-dependent. Size also determines NP diffusivity, and then the ability of NPs to permeate cell membranes. PSD analysis also allows for monitoring NP aggregation or release of NP surface modifiers. These modifications can be result of preservation conditions, concentration effects or chemical properties of the dispersing medium (pH, ionic strength), and they alter the NP properties. Size-characterization is therefore a key step in the quality control process of NP synthesis and application.

Various methods of NP size analysis are available, which are based on different properties of the NPs. Different methods however give just partially uncorrelated size information, because the definition of “size” (e.g. geometrical, hydrodynamical, optical) is method-dependent. Therefore, there is not a single method able to fully size-characterize complex, nanostructured samples, and it can be impossible to compare the different results. For instance, scanning or transmission electron microscopy (SEM, TEM) allow for the direct determination of geometric size and shape of NPs. Compositional and structural analysis of multilayer NPs is also possible by TEM if different layers are characterized by different electron diffraction. Size analysis by electron microscopy is however labor intensive, due to the complex sample preparation and to the very large number of particles that must be observed to obtain a statistically significant PSD analysis. Moreover, since NPs are observed in dried conditions under a high-energy electron source, the observed size/morphology may significantly differ from the native size/morphology, i.e. when the NPs are in liquid dispersion. Light scattering (LS) methods are broadly used to size-analyze dispersed particles. Dynamic LS (DLS) is a widespread technique for PSD analysis of NPs [9]. DLS measures the Stokes diffusion coefficient ( $D$ ) of NPs in the dispersing medium, which is correlated to the NP hydrodynamic radius ( $r_h$ ). DLS analysis is fast, and it requires limited sample manipulation since NPs can be analyzed in any dispersing medium. However, DLS gives no information on particle shape and density distribution. In case of samples with complex, multimodal PSD, accuracy of DLS-based PSD analysis may be also limited. Static, multi-angle LS (MALS) measures the angular dependence of the LS intensity. MALS detection allows for the  $M_r$  determination of NPs without referring to calibration if sample concentration and the specific refractive index increment ( $dn/dc$ ) are measured or known [10]. MALS detection also gives independent information on the NP root-mean-square (rms) radius (or radius of gyration,  $r_g$ ), which represents the mass-averaged distance of each mass element in the NP from its center of gravity. Since the ratio between  $M_r$  and  $r_g$  depends on NP shape and density distribution, MALS detection can also provide information on the NP conformation and internal structure. MALS detection is applicable in a size range from 1 nm to over 1  $\mu$ m, but its sensitivity decreases with decreasing particle size, and with currently available MALS systems accurate  $r_g$  determination is limited to particles with  $r_g > 10$  nm. As in the case of DLS, MALS detection accuracy is reduced for samples with complex and multimodal PSD. Hyphenation of DLS or MALS detection with size-based separation methods can then enhance accuracy of size analysis of complex NP samples. This is because size-separation reduces sample complexity prior to size analysis, and this allows to applying sizing methods to narrowly distributed fractions of the samples. Using size-separation methods, monodisperse NP fractions can also be collected for micropreparation purposes and/or for other off-line characterization approaches using uncorrelated methods.

Size-exclusion chromatography (SEC) has been applied to size-separate complex NP samples, including QDs [11]. However, SEC selectivity is quite limited for very-large  $M_r$  analytes such as NPs, and interactions with the stationary phase can alter NP retention, morphology, and recovery, with consequently severe alteration of PSD analysis results. This is also true for packed-column, hydrodynamic chromatography (HDC). Flow field-flow fractionation (F4) is

a flow-assisted technique ideally suited to size-separate dispersed analytes over a broad size range [12,13]. Unlike SEC, the typical NP size range is perfectly centered within the application range of F4: polystyrene NPs have been used as standard analytes to develop F4 instrumentation and methods. The F4 principle is based on the simultaneous action of a flow stream of dispersing medium along a capillary channel and of a hydrodynamic field generated by a second stream of dispersing medium across the channel. Unlike chromatography, rather than by the interaction with a stationary phase, F4 separation is achieved by the physical interaction of dispersed sample components with the hydrodynamic field. This makes F4 a “gentle” separation method for NPs in native, liquid dispersion conditions. In F4, retention times of the NPs are inversely proportional to their  $D$  values [13]. NPs are then fractionated according to their hydrodynamic size, with retention time that is directly proportional to  $r_h$ . On-line coupling of F4 with LS detection techniques such as MALS then appears to be an ideal, hyphenated methodology for the simultaneous size-separation and characterization of complex NP samples.

Asymmetrical F4 (AF4) currently is the most-developed and applied F4 variant. In AF4 the hydrodynamic field is generated by splitting the longitudinal flow into a second flow stream (cross-flow) across the only permeable wall that constitutes the fractionation channel [14]. Because of this channel geometry, AF4 allows for focusing the sample into a very narrow band before the elution, which increases fractionation efficiency. Over more than 10 years, on-line AF4-MALS has made it possible to size-separate and characterize NPs [15–17]. By AF4-MALS, the  $r_g$  and  $M_r$  distribution can be obtained for even broadly dispersed NP samples. The  $r_h$  values can be calculated from the  $t_r$  values according to the AF4 theory [14]:

$$r_h = \frac{kTV_0}{\pi\eta V_c w^2 t_0} t_r \quad (1)$$

where  $\eta$  is the mobile phase viscosity,  $V_c$  the cross-flowrate, and  $w$  the AF4 channel thickness. The so-determined  $r_h$  values can be compared to the  $r_g$  values determined by MALS to obtain information on particle shape and morphology, since  $r_h/r_g$  values depend on particle shape.

AF4-MALS has been found effective for the analysis and characterization of complex NPs in many fields, from environmental science [18] to pharmaceuticals [19]. AF4-MALS methods were described for the characterization of drug-carrier gelatin NPs [20], and of super-paramagnetic iron oxide (SPIO) NPs used in diagnostic and therapeutic nanomedicine [21]. In this work we have applied AF4-MALS to biocompatible NPs that are of increasing use in nano-biotechnology and nanomedicine, like polymer-coated gold NPs, surface-derivatized, fluorescent silica NPs, and water-soluble, biocompatible QDs. The NPs were size-fractionated, and their  $r_h$  distribution obtained from the retention time distribution was compared to the  $r_g$  distribution determined by MALS detection. The obtained  $r_h/r_g$  distribution gave information on the NP conformation, and on possible NP aggregation. The structured NPs were separated from the (relatively) low- $M_r$  sample components used as functionalizing reagents. To provide additional information on the “bound” and “unbound” components, we also applied on-line photodiode-array (PDA) UV/vis and refractive index (RI) detections to AF4-MALS.

## 2. Experimental

### 2.1. Samples

#### 2.1.1. Polymer-coated gold NPs

Polymer-coated gold NPs were synthesized as described elsewhere [22]. Their geometric PSD was determined by TEM, and

**Table 1**  
AF4 experimental conditions.

Sample <sup>a</sup>	QDs #1, 2#, #3	QDs #4	Silica NPs	Gold NPs
Channel length (mm)	152	152	240	240
Channel width (mm)	21.5	21.5	21.5	16
Channel thickness (μm)	350	350	350	(a) 250 and (b) 350
Membrane cut-off (kDa)	30	30	10	5
Carrier liquid	5 mM borate buffer (pH 9.1)	5 mM NaNO <sub>3</sub> , 0.02% NaN <sub>3</sub>	(a) 50:50% (v/v) EtOH/H <sub>2</sub> O; (b) 5 mM Tris, buffer (pH 8.7)	10 mM NaCl
Detector flowrate (mL)	1.00	(a) 0.50; (b) 1.00; (c) 1.50	(a) 0.70; (b) 1.00	0.50
Cross-flowrate (start → end, mL)	4.00 → 0.00	(a) 0.30 → 0.30; (b) 0.60 → 0.60; (c) 0.90 → 0.90	(a) 0.20 → 0.20; (b) 0.25 → 0.00	1.00 → 0.00
Cross-flow gradient time (min)	9 (starting from 6 min elution)	Isocratic	(a) Isocratic; (b) 40	20
Focusing flowrate (mL)	1.50	1.00	(a) 0.50; (b) 1.00	1.00
Focusing time (min)	1	1	2	2

<sup>a</sup> See Section 2.1 for sample descriptions.

resulted to be  $15 \pm 3$  nm [23]. The gold NP cores were coated with multiple, alternate layers of oppositely charged polyelectrolytes: (1) positively charged poly(allylamine hydrochloride) (PAH,  $M_r = 15\,000$ ), and (2) negatively charged poly(styrene sulfonate) (PSS,  $M_r = 4300$ ) with PAH as inner layer. NPs were injected in aqueous dispersion at a concentration of  $10^{-8}$  M.

### 2.1.2. Fluorescent silica NPs

Oligothiophene-doped silica NPs were prepared by sol-gel synthesis according to the van Blaaderen-modified Stöber procedure [24]. The blue emitting thiophene dye (kindly supplied by Mediteknology Srl, Bologna, Italy) was coupled to (3-aminopropyl) triethoxysilane, and then incorporated in the synthesis of the silica NPs by hydrolysis and condensation with tetraethylorthosilicate in a mixture of water, ammonia and ethanol [25]. SEM photographs indicated the presence of spherical and narrowly dispersed NPs with an average diameter of 35–40 nm. Samples were filtered on 0.2 μm cellulose filters (Millipore), and the filtered fraction was injected undiluted or 1:10 diluted in 3 μM NaOH.

### 2.1.3. QDs

Three QD samples (samples #1, #2, and #3) with CdSe cores were covered with a first, protecting layer made of ZnS. The CdSe core diameters were estimated to be 3.1, 3.3 and 3.4 nm from their maximum absorption wavelengths, which are size-dependent [26]. CdSe/ZnS core/shell particles were capped with a surfactant (trioctylphosphine oxide), and then coated with an amphiphilic polymer. This was synthesized by linking amino-functionalized hydrophobic hydrocarbon chains (dodecyl-amine) to a polar backbone (poly(isobutylene-*alt*-maleic anhydride)). The hydrocarbon side chains of the polymer intercalated with the hydrophobic surfactant molecules. Exposition of the hydrophilic polymer chain on the outer QD surface [27] made the QDs be hydrophilic, and the samples were dispersed in water at a concentration of  $\sim 1.2$  μM. Aliquots of 50 or 100 μL were injected. A fourth sample of hydrophilic, polysaccharide-coated QDs with a CdSe/CdS core (CAN GmbH, Hamburg, Germany) was dispersed in water at a concentration of 80 mg/dL (sample #4). The QD core size was determined by TEM to be 5.5 nm.

### 2.2. AF4-MALS

AF4 was performed using an Agilent 1100 liquid chromatography system (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) equipped with an Eclipse 3 Separation System (Wyatt Technology Europe, Dernbach, Germany). Two AF4 channels of different dimensions were employed: a 24 cm × 1.6 cm (length × width) or a 15.2 cm × 2.15 cm channel. Channel thickness was 250 or 350 μm. Regenerated cellulose membranes (Wyatt Technology Europe) with 10 or 30 kDa molar mass cut-off were used as accumulation wall. Carrier solu-

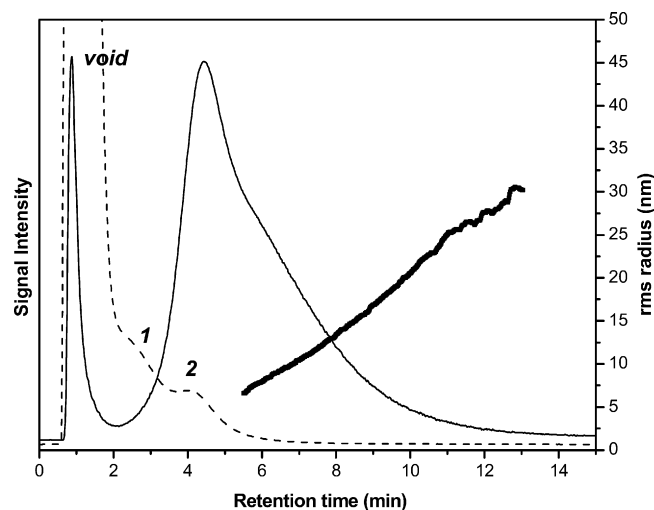
tions were prepared using MilliQ water (Millipore, Billerica, MA) and HPLC-grade solvents. All solutions were filtered on 0.1 μm cellulose membrane filters (Millipore). Table 1 summarizes the channel characteristics, carrier solution compositions, and flowrate programs employed for fractionating the different samples. After completion of the elution program, cross-flowrate was maintained at 0.00 mL/min for at least 5 min to ensure complete elution of largest particles.

On-line detection of the eluted species was performed with an Agilent 1100 PDA UV/vis spectrophotometer, a DAWN HELEOS MALS (Wyatt Technology Corporation, Santa Barbara, CA), and an Optilab rEX RI detector (Wyatt Technology Corporation). The software package Wyatt Eclipse @ ChemStation Version B.03.01 (Wyatt Technology Europe) was used to set and control the flowrate values and the PDA detector. Astra V software (Wyatt Technology Corporation) controlled the RI and MALS detectors. Wyatt Chromatogram version 1.0.3 (Wyatt Technology Europe) was used to calculate the hydrodynamic diameters from retention time values, based on the AF4 theory [28].

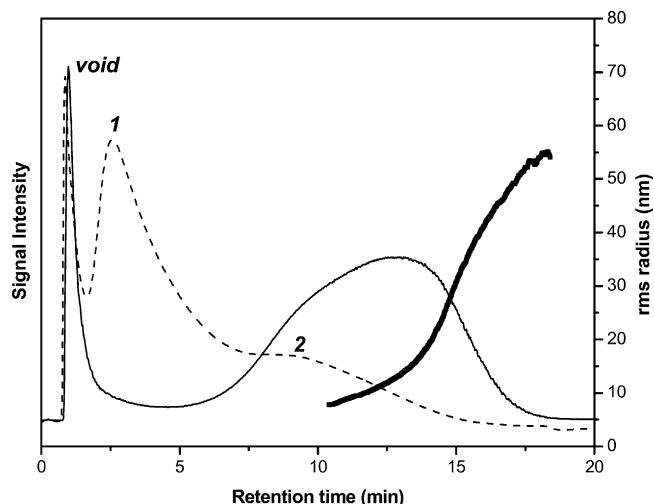
## 3. Results and discussion

### 3.1. Polymer-coated gold NPs

Applications of gold NPs are spreading in many fields of nanotechnology, from catalysis to bioapplications such as in vivo



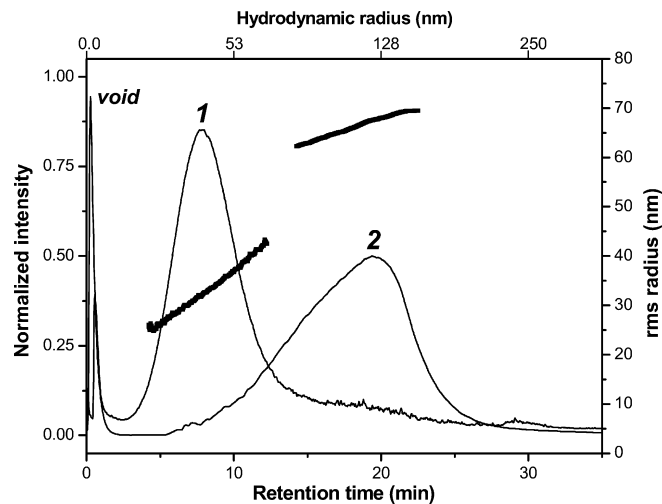
**Fig. 1.** AF4-MALS fractogram of PAH/PSS-coated gold NPs. Dashed line: UV/vis absorbance at 230 nm; thin, full line: light scattering detection at 90°; thick, full line:  $r_g$  values determined from MALS detection. Experimental conditions are reported in Table 1 (gold NPs, method a).



**Fig. 2.** AF4-MALS fractrogram of PAH/PSS/PAH-coated gold NPs. Dashed line: UV/vis absorbance at 230 nm; thin, full line: light scattering detection at  $90^\circ$ ; thick, full line:  $r_g$  values determined from MALS detection. Experimental conditions are reported in Table 1 (gold NPs, method b).

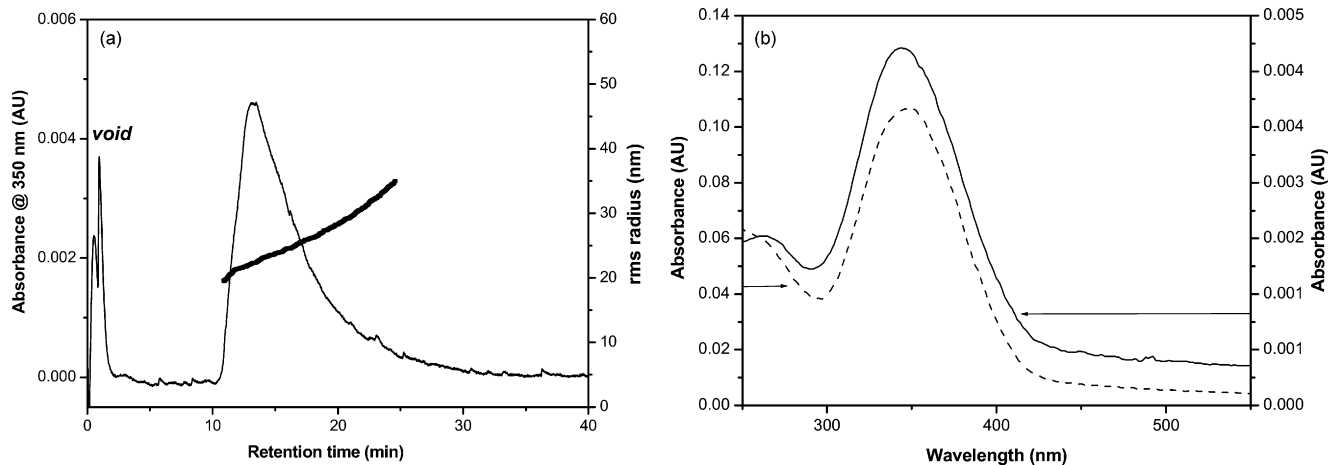
imaging and tracing, or drug delivery. Layer-by-layer (LBL) deposition is a very promising technique for the encapsulation and surface derivatization of “ensheathed” gold NPs [29]. The LBL technique is based on sequential coating of gold NPs with polyelectrolytes of alternate charge, which are assembled by electrostatic interactions. Removal of unreacted polymer molecules after each step is critical to control the layer deposition and, consequently, to obtain homogeneous NPs.

Fig. 1 shows a representative AF4-MALS-UV/vis profile of the gold NPs coated with a double layer of PAH and PSS. The MALS trace (thin, full line) is proportional to the intensity of the light scattered at  $90^\circ$ . It presents a sharp peak at the void time, and a broad band of retained NPs spanning 2–12 min in retention time. From the MALS signal processed in correspondence of the band maximum ( $t_r = 4.4$  min) one gets an  $r_g$  value smaller than 10 nm, which is considered to be the lower limit for accurate size measurements by means of the MALS detector here employed. At this limit, measured  $r_g$  values then lack significance. However, an  $r_g$  value lower than 10 nm was expected for single, coated gold NPs having a core with geometrical radius of  $7.5 \pm 1.5$  nm, as determined by TEM. At higher retention times ( $t_r > 7$  min),  $r_g$  values from 10 to 30 nm were

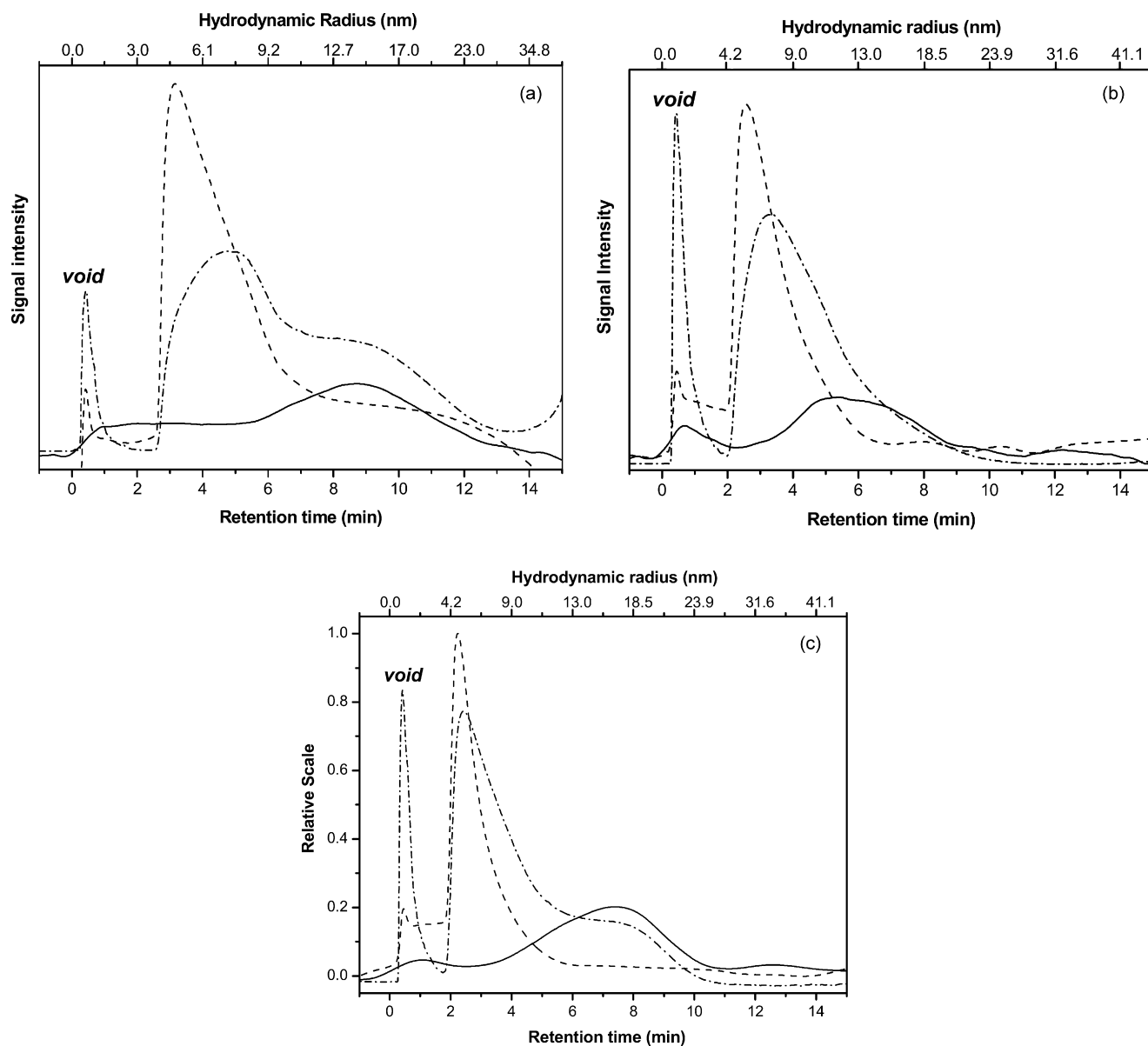


**Fig. 4.** AF4-MALS fractograms of oligothiophene-doped silica NPs injected at different concentrations. (1) Diluted sample; injection volume: 200  $\mu$ L. (2) Tenfold concentrated sample; injection volume: 20  $\mu$ L. Experimental conditions reported in Table 1 (silica NPs, method b).

determined, which correspond to geometric diameters of 25–75 nm (assuming a spherical shape). These values are much bigger than the diameters of the gold cores. However, such an increase in NP size cannot be explained by the presence of the polymer shell, which is expected to increase the size of no more than 1–2 nm per layer [23]. This finding then suggests the possible presence of NP aggregates. The UV/vis absorbance trace at 230 nm (dashed line) is also reported in Fig. 1. At this wavelength, both NPs and free polymer molecules can be detected. The trace presents a very intense absorption (peak max = 2.1 AU, off-scale) at the void time. This signal can be associated to free PSS molecules that are not expected to be retained due to the relatively low  $M_r = 4300$ . Two weaker bands can be also observed in the UV/vis trace, at  $t_r = 2.6$  (band 1) and 4.3 min (band 2). Band 2 is found in correspondence of the MALS trace maximum, and it could be thus due to retained, gold NPs. Band 1 was likely due to polymer aggregates that were not conjugated with gold NPs. The UV/vis trace drops to zero after 6 min, when an intense MALS signal is still present. This is because MALS sensitivity increases with increasing NP size, while UV/vis sensitivity decreases with increasing NP size.



**Fig. 3.** (a) AF4-MALS fractrogram of oligothiophene-doped silica NPs. Thin line: UV/vis absorbance at 350 nm; thick line:  $r_g$  values determined from MALS detection. Experimental conditions are reported in Table 1 (silica NPs, method a). (b) UV/vis absorption spectrum of: fractionated silica NPs at  $t_r = 13.25$  min (full line, absorbance scale on the right y-axis); unbound oligothiophene dye in solution (dashed line, absorbance scale on the left y-axis).



**Fig. 5.** AF4-MALS fractograms of QD samples (a) #1, (b) #2 and (c) #3. Dot-dashed line: light scattering signal at 90°; dashed line: RI signal; full line: UV/vis absorption signal at (a) 533 nm, (b) 562 nm, and (c) 566 nm. Experimental conditions reported in Table 1 (QDs #1, 2#, #3).

Fig. 2 shows a representative AF4-MALS-UV/vis profile obtained for the gold NP sample coated with a triple layer of PAH/PSS/PAH. The MALS trace (thin, full line) shows that the NPs were eluted at  $t_r$  values ranging 7–17 min. As in the case shown in Fig. 1, for the first part of the band (7 min <  $t_r$  < 12 min) the determined  $r_g$  values (thick, full line) were around the size limit value for accurate size measurements by the MALS detector here employed. For  $t_r > 12$  min, the  $r_g$  values increase from 10 to 55 nm, with an  $r_g = 12$  nm found at the band maximum ( $t_r = 12.8$  min). This indicates the presence of NPs at an aggregation state (in terms of aggregate size and relative concentration) higher than in the case of the double-layered NP sample (Fig. 1). The higher aggregation state can be explained by the fact that, with respect to double-layered NPs, for triple-layered NPs the LBL coating procedure requires an additional centrifugation step. Additional centrifugation can actually increase NP aggregation. The UV/vis trace at 230 nm (dashed line) presents two bands, at  $t_r = 2.5$  min (band 1) and at  $t_r = 9.2$  min (band 2). As in the double-layered, PSS/PAH gold NPs in Fig. 1, the first band was due to the

elution of free polymer molecules. However, since PSS molecules had  $M_r = 15\,000$ , band 1 in Fig. 2 is found at higher retention time than band 1 in Fig. 1.

These results show AF4-MALS-UV/vis to be able to size-characterize multiple-layer, gold NPs and their aggregates, and to give single-run, qualitative and quantitative information on the presence of “free” (unbound) polymer in the NP sample. The unbound polymer still present in the sample solution was effectively separated from the NPs that, if necessary, could be collected as purified fractions for further characterization or surface modifications.

### 3.2. Fluorescent silica NPs

Silica NPs are very promising three-dimensional scaffolds for the synthesis of multi-chromophoric nanostructures. A challenging task in the synthesis and characterization of fluorescent NPs is their separation from the unreacted fraction of the fluorophore.



This is required to accurately assess the spectroscopic behavior of the fluorophore molecules that are actually included in the NPs. In previous work some of us had characterized, using F4 and off-line fluorescence spectroscopy, silica NPs covalently modified with fluorescent units [30]. In that work F4 had been able to fractionate the NPs from the unreacted fraction of the fluorophore, and fluorescence spectroscopy on collected NP fractions had confirmed the association between NPs and the fluorophore.

Fig. 3a shows the AF4-MALS-PDA/UV/vis trace of the oligothiophene-doped silica NPs. The UV/vis trace (thin line) was recorded at 350 nm, which is the absorption maximum of the oligothiophene dye. It shows a band at  $t_r$  values ranging 10–25 min. MALS detection gave an  $r_g$  distribution (thick line) ranging 20–35 nm, with an  $r_g = 22$  nm at the NP band maximum. The UV/vis absorption signal observed for the NP band can be thus certainly ascribed to the fluorophore molecules associated to NPs. The goal of NP separation from the unbound fluorophore molecules present in the sample was then achieved, since species of  $M_r$  lower than the channel membrane pore cut-off were filtered out during the fractionation process, or they were partly eluted with the void peak.

On-line PDA detection allowed for on real-time recording absorption spectra of the eluted species. Fig. 3b (full line) reports the absorption spectrum at  $t_r = 13.25$  min, i.e. in correspondence of the fractionated NP band maximum. It is compared with the absorption spectrum of the oligothiophene dye in solution (dashed line). The absorption maximum wavelength and the absorption band shape coincide. This confirms the presence of bound fluorophore in the fractionated NPs, and it allows for a straightforward comparison of the spectroscopic properties of the free and bound fluorophore.

Significant information on possible NP aggregation could be also achieved. Fig. 4 reports the results obtained by injecting the same amount of fluorescent silica NPs taken from two samples in which the NPs were present at different concentrations: sample 2 was 10 times more concentrated than sample 1. The two profiles (thin lines) are very different. Sample 1 profile shows a maximum at 7.8 min retention time, which corresponds to an  $r_h$  value of 40 nm. MALS detection (thick line) gave at this retention time an  $r_g$  value of 30 nm. The resulting  $r_g/r_h = 0.75$  is in good agreement with the value predicted for a compact sphere ( $r_g/r_h = 0.77$ ). This suggests that, under low concentration conditions, the sample mostly contained single, spherical NPs. Sample 2 profile in fact shows a maximum at 19.8 min retention time, which is much higher than retention time of the profile 1 maximum. It corresponds to an  $r_h = 130$  nm. MALS detection (thick line) gave at this retention time an  $r_g = 66$  nm, and then an  $r_g/r_h = 0.50$ . This ratio value is different from the value predicted for spherical particles. These results indicate the presence in sample 2 of large, non-spherical aggregates, which were likely due to the presence in the sample of NPs at high concentration.

### 3.3. QDs

QDs are nanostructured, semiconductor materials ranging from 1 to >10 nm in diameter. Strong size-dependence of the QD spectroscopic properties makes QD emission tunable, which is a very appealing feature for QD applications in nanotechnology. To make these NPs suitable for biological applications, QDs must be however made biocompatible and hydrophilic by surface modification with polymeric layers. AF4 was already proved able to fractionate water-soluble QDs, but no MALS detection was applied to AF4 to obtain a complete size-characterization [31].

Fig. 5a–c shows the AF4-MALS fractograms obtained for samples #1, #2, and #3, respectively. The UV/vis (full line), RI (dashed line) and LS at 90° (dot-dashed line) detection traces are reported. The UV/vis signals were generated by the QD cores, since the polymeric modifiers do not absorb at the selected wavelength. The

UV/vis detection wavelength value was then set for each sample at the wavelength of the QD core absorption maximum: 533, 562 and 566 nm for samples #1, #2, and #3, respectively. These values were calculated from QD core size by means of the approach reported in the literature [26]. Retention times were measured from the UV/vis traces and, as for the other NP samples analyzed in this work, converted in  $r_h$  values (upper x-axis) according to the AF4 retention theory. The so-obtained  $r_h$  values ranged 9–25 nm, with a maximum at ~15 nm that indicated the presence of a polymeric shell thickness of ~12 nm. Accurate  $r_g$  values could not be determined from MALS signals because, as suggested by the  $r_h$  values determined from retention times, they might have been around 10 nm, which is the lower limit for accurate size measurements with the MALS detector here employed. However, for all the three samples the LS trace at 90° and the RI trace revealed the possible presence of a second population, which was retained at 2–6 min, and which then showed a size ( $r_h = 3–10$  nm) lower than the QD size. The absence of UV/vis absorbance indicated that such smaller particles could not be QD cores, but constituted of polymer and/or surfactant nanostructures that self-assembled without including a QD core. These findings, which give fundamental information for the synthesis and applications of QDs, would be hardly obtained by stand-alone light scattering and/or spectroscopic techniques. In fact, without a size-separation method, light scattering methods can hardly discriminate between bulk and core/shell NPs of comparable size. This would be the case of polymer-coated QDs and polymer/surfactant nanostructures that self-assembled without including a QD core. Otherwise, spectroscopic methods able to distinguish NPs of different chemistry cannot discriminate particles of different size without using a size-separation method. AF4-MALS then shows able to provide size-characterization of coated QDs, and to simultaneously determine the possible presence in the sample of non-QD species likely originated from self-assembly of the components used for coating the QDs. Detection of one or more of the elements contained in the QDs (e.g. Cd) could provide direct information on the presence of the QD cores in the fractionated NPs. Such information could be obtained, for instance, by on-line coupling AF4 with ICP-AES or ICP-MS [32]. However, coupling AF4 with techniques of elemental analysis is beyond the aims of the present paper.

Stability of the polymer layer(s) is key feature for biological applications of QDs since encapsulation of the nanocrystalline core guarantees water solubility and it prevents possible toxic effects

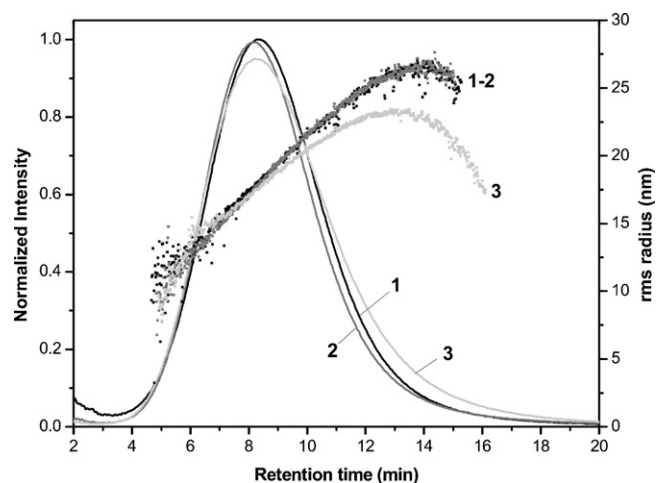


Fig. 6. AF4-MALS fractograms of QD sample #4 under different shear stress conditions. Light scattering signal at 90° (full lines) and calculated  $r_g$  values (dotted lines). Elution flowrate: (1) 0.5 mL/min, (2) 1.0 mL/min, and (3) 1.5 mL/min. Experimental conditions reported in Table 1 (QDs #4).

due to the core chemistry. QD coating stability can be studied by AF4-MALS. Fig. 6 shows profiles obtained under different flow conditions for the QD sample #4. The longitudinal flowrate was set to 0.5 (trace 1), 1.0 (trace 2) and 1.5 mL/min (trace 3), and the cross-flowrate was proportionally increased to maintain QD retention time constant. At higher flowrates, QDs were eluted closer to the accumulation membrane and, then, they were subjected to higher shear stress. QDs were in all cases eluted in a 4–16 min retention time range, and they contained particles of  $r_g$  ranging 10–30 nm. Traces 1 and 2 are identical: they were obtained with longitudinal flowrate values of 0.5 and 1.0 mL/min, respectively. Nonetheless, trace 3 shows a decrease in  $r_g$  with increasing retention times (11–16 min). It was obtained at a longitudinal flowrate of 1.5 mL/min and, because of this higher flowrate conditions, the higher shear stress might have induced release of the polymer coating.

#### 4. Conclusions

AF4-MALS is here shown to be a mature methodology to analyze and characterize different samples of structured NPs of increasing applications in nano-biotechnology. AF4 gave time-resolved size-separation of the NPs, which allowed to (a) identifying possible effects on the stability of the structured NPs, and (b) obtaining through on-line MALS detection the mass-balanced average size ( $r_g$ ) distribution of the NPs. Even in the cases of NP size for which  $r_g$  determinations cannot be accurately performed, AF4-MALS shows to be unique methodology to detect and size-characterize even small amounts of NP aggregates. This is for two reasons: (1) AF4 separates the aggregates from single NPs, and (2) MALS detection sensitivity increases with increasing particle size.

We can then conclude that AF4-MALS may soon become standard, routine methodology to be implemented into comprehensive approaches for the analysis and characterization of structured NPs. We can support this belief by at least three reasons. Firstly, the “gentle” separation mechanism of AF4 does not alter the critical core-shell/surface composition and conformation of structured NPs. This allows to investigating the effect of NP sample concentration on the NP aggregation. Secondly, AF4 can separate the unbound constituents of the structured NPs, which are possibly present in the sample. This feature can be exploited to optimize synthesis of structured NPs, and to confirm actual presence state of the functionalizing agents at the nanodispersed. The latter is fundamental aspect in the characterization of structured nanomaterials. Finally, the  $r_h/r_g$  distribution measured by AF4-MALS is a fundamental parameter to characterize morphology aspects of core-shell/surface structured NPs.

#### Acknowledgments

Work partially supported by the University of Bologna (Progetto Strategico di Ateneo 2006 “LIGHT4HEALTH”). M.M. thanks the Italian Ministry of Education, University and Research for supporting her fellowship (FIRB project RBNE03S7XZ.005). Thanks also goes to Mediteknology Srl (Bologna, Italy) for supplying the fluorophore used for silica NP derivatization, and to CAN GmbH (Hamburg, Germany) for providing some of the QD samples.

#### References

- [1] M. Di Ventra, S. Evoy, J.R. Heflin, *Introduction to Nanoscale Science and Technology*, Springer, New York, 2004.
- [2] P. Poole, F.J. Owens, *Introduction to Nanotechnology*, Wiley, Hoboken, NJ, 2003.
- [3] W.H. Suh, Y.-H. Suh, G.D. Stucky, *Nano Today* 4 (2009) 27.
- [4] M. Valcárcel, B.M. Simonet, S. Cárdenas, *Anal. Bioanal. Chem.* 391 (2009) 1881.
- [5] L. Wang, W. Zhao, W. Tan, *Nano Res.* 1 (2008) 99.
- [6] M.-C. Daniel, D. Astruc, *Chem. Rev.* 104 (2004) 293.
- [7] V. Biju, T. Itoh, A. Anas, A. Sujith, M. Ishikawa, *Anal. Bioanal. Chem.* 391 (2008) 2469.
- [8] J.M. Costa-Fernández, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, *TrAC, Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 207.
- [9] B. Berne, R. Pecora, *Dynamic Light Scattering with Applications to Chemistry, Biology, and Physics*, Dover Publications, Mineola, NY, 2000.
- [10] P.J. Wyatt, *Anal. Chim. Acta* 272 (1993) 1.
- [11] K.M. Krueger, A.M. Al-Somali, J.C. Falkner, V.L. Colvin, *Anal. Chem.* 77 (2005) 3511.
- [12] J.C. Giddings, *Science* 260 (1993) 1456.
- [13] S.K. Ratanathanawongs-Williams, in: M.E. Schimpf, K.D. Caldwell, J.C. Giddings (Eds.), *Field-Flow Fractionation Handbook*, Wiley-Interscience, NY, 2000 (Chapter 17).
- [14] K.G. Wahlund, in: M.E. Schimpf, K.D. Caldwell, J.C. Giddings (Eds.), *Field-Flow Fractionation Handbook*, Wiley-Interscience, NY, 2000 (Chapter 18).
- [15] D. Roessner, W.M. Kulicke, *J. Chromatogr. A* 687 (1994) 249.
- [16] H. Thielking, D. Roessner, W.M. Kulicke, *Anal. Chem.* 67 (1995) 3229.
- [17] P.J. Wyatt, *J. Colloid Interface Sci.* 197 (1998) 9.
- [18] S. Dubascoux, F. Von Der Kammer, I. Le Hecho, M.P. Gautier, G. Lespes, *J. Chromatogr. A* 1206 (2008) 160.
- [19] C. Augsten, K. Mader, *Pharm. Ind.* 68 (2006) 1412.
- [20] W. Fraunhofer, G. Winter, C. Coester, *Anal. Chem.* 76 (2004) 1909.
- [21] J. Lohrke, A. Briel, K. Mäder, *Nanomedicine* 3 (2008) 437.
- [22] J. Turkevich, P.C. Stevenson, J. Hillier, *Discuss. Trans. Faraday Soc.* 11 (1951) 55.
- [23] J. López-Viota, S. Mandal, A.V. Delgado, J.L. Toca-Herrera, M. Möller, F. Zanuttin, M. Balestrino, S. Krol, *J. Colloid Interface Sci.* 332 (2009) 215.
- [24] A. van Blaaderen, A. Vrij, *J. Colloid Interface Sci.* 156 (1993) 1.
- [25] W. Stöber, A. Fink, E. Bohn, *J. Colloid Interface Sci.* 26 (1968) 62.
- [26] W.W. Yu, L. Qu, W. Guo, X. Peng, *Chem. Mater.* 15 (2003) 2854.
- [27] T. Pellegrino, L. Manna, S. Kudera, T. Liedl, D. Koktysh, A.L. Rogach, F. Keller, J. Rädler, G. Natile, W.J. Parak, *Nano Lett.* 4 (2004) 703.
- [28] K.G. Wahlund, J.C. Giddings, *Anal. Chem.* 59 (1987) 1332.
- [29] M. Chanana, A. Gliozzi, A. Diaspro, I. Chodnevskaja, S. Huewel, V. Moskalenko, K. Ulrichs, H.-J. Galla, S. Krol, *Nano Lett.* 5 (2005) 2605.
- [30] M. Montalti, L. Prodi, N. Zaccheroni, A. Zattoni, P. Reschiglian, G. Falini, *Langmuir* 20 (2004) 2989.
- [31] T. Rameshwar, S. Samal, S. Lee, S. Kim, J. Cho, I.S. Kim, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 6 (2006) 2461.
- [32] S. Dubascoux, I. Le Hecho, M.P. Gautier, G. Lespes, *Talanta* 77 (2008) 60.



**G.3 SOL-GELS DOPED WITH POLYMER-COATED  
ZNS/CDSE QUANTUM DOTS FOR THE DETECTION OF  
ORGANIC VAPORS.**

M. Hasani, A. M. Coto-García, J. M. Costa-Fernández, A. Sanz-  
Medel

Sensors and Actuators B, 144 (2010) 198-202





## Sol–gels doped with polymer-coated ZnS/CdSe quantum dots for the detection of organic vapors

Masoumeh Hasani<sup>a,\*</sup>, Ana M. Coto García<sup>b</sup>, José M. Costa-Fernández<sup>b</sup>, Alfredo Sanz-Medel<sup>b,\*\*</sup>

<sup>a</sup> Faculty of Chemistry, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

<sup>b</sup> Department of Physical and Analytical Chemistry, University of Oviedo, c/Julián Clavería 8, 33006 Oviedo, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 20 March 2009

Received in revised form 14 October 2009

Accepted 23 October 2009

Available online 13 November 2009

#### Keywords:

Quantum dots

Fluorescence

Volatile organic compounds

Sol–gels

Multivariate analysis

### ABSTRACT

A novel luminescent sensing material for the detection and discrimination of different organic vapors has been developed and characterized. For such purpose, colloidal polymer surface-modified ZnS/CdSe semiconductor quantum dots (QDs) were synthesized and trapped into sol–gel inorganic matrices following a simple and friendly procedure. It was observed that the QDs entrapped into the sol–gels maintain invariable optical properties. Moreover, rapid and reversible quenching of the fluorescence from the immobilized QDs upon exposure of the doped sol–gel materials to several organic vapors was observed, with the onset of the quenching process being dependent on the target gas type and on its concentration.

After a necessary previous photoactivation, the luminescence of the immobilized quantum dots was found to exhibit a distinct behavior when exposed to different organic vapors at atmospheric pressure. The sensing response from the surface-modified quantum dots was also dependent upon the porous sol–gel matrix composition.

Two different active materials were prepared using the same colloidal polymer-coated ZnS/CdSe QDs but changing the composition of the precursors used during the sol–gel preparation and doping process. After exposing the synthesized materials to the different organic analytes gaseous samples, the measured luminescence responses were processed, by multivariate analysis and a dynamic pattern recognition method. Results obtained demonstrated the analytical potential of ZnS/CdSe doped sol–gels as luminescent sensing materials for the rapid detection of organic vapors in contaminated atmospheres.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Development of chemical sensors with advanced recognition capabilities is required for the rapid detection and identification of environmental pollutants, in particular for low vapor pressure toxic species such as volatile organic compounds (VOCs) which can produce liver or nervous system problems and increased risk of cancer [1]. Thus, there is an urgent demand to develop chemical sensors able to respond selectively, rapidly, reliably and reproducibly to the presence of VOCs. Organic reagents typically employed to develop sensor phases for optical sensors often suffer from some intrinsic limitations, including rapid photobleaching and low sensitivity to the analytes. Conversely, semiconductor luminescent nanocrystals, known as “quantum dots” (QDs), exhibit unique optoelectronic properties including high luminescent quantum yields, tuneable emission, high photostability and relatively long emission lifetimes. All those advantageous explain its present

importance and applications as luminescent indicators for optical sensing [2].

In general, sensing methods based on nanostructures rely on interactions between their surface atoms and the environment [3]. Therefore, luminescent nanocrystals can be ideal candidates for sensing purposes due to their extremely large surface atom ratio [4]. Moreover, fundamental studies dealing with the characterization of the photoluminescence properties of quantum dots revealed that the photoluminescence properties of QDs depend strongly on their surface state [5]. Thus, eventual chemical or physical interactions between a given chemical species analyte with the surface of the nanoparticles would result in changes on the QD surface charges and so it would affect the QDs photoluminescence emission. This effect could potentially be exploited for the development of sensing technologies for “reactive species” [4]. In fact many of the QDs-based optical probes reported so far are based on measurement of the fluorescence changes that occur as a result of the analyte–surface interaction.

In this vein, high-quality CdSe nanocrystals have proved to exhibit a strong luminescence that is significantly affected by reactive gases interaction with their surface. Recent work by Nazzal et al. used CdSe quantum dots embedded into polymeric films as

\* Corresponding author. Tel.: +98 811 8282807.

\*\* Corresponding author. Tel.: +34 985 103 474.

E-mail addresses: [hasani@basu.ac.ir](mailto:hasani@basu.ac.ir) (M. Hasani), [asm@uniovi.es](mailto:asm@uniovi.es) (A. Sanz-Medel).

potential gas sensors [6] using photoluminescent changes of QDs (coated by a monolayer of organic ligands) brought about by interactions with different gaseous amines. This finding may open the door to the development of new sensors based on QDs. In a more recent paper, Potyrai and Leach evaluated the response of the luminescence from CdSe nanoparticles of different size incorporated into a polymer film to the exposure of polar and non-polar vapors [7]. There, different size nanocrystals incorporated in the film provided their individual photoluminescence response pattern when the sensor film was exposed to methanol and toluene. Authors claim that the observed differences in the response patterns of the nanocrystals could be related to the combined effects of changing their size, in the dielectric medium surrounding the nanocrystals, and in possible oxidation processes [7].

Here, we report a new approach for the detection and discrimination of volatile organic solvents based on the changes on the luminescence of QDs that occur when such volatile compounds interact with the polymer-coated ZnS/CdSe QDs entrapped in an inorganic sol–gel matrix. Advantages of the use of sol–gel as special inorganic matrices for active phases development include optical transparency, the chemical inertness of the glass, the relative simplicity of the process, the potential to form a variety of shapes and sizes of material, and most importantly, the ease of entrapment of the luminescent reagent during the polymerization process [8]. Multivariate data analysis has been employed as well to allow a selective detection of the compounds by analyzing the dynamic photoluminescence responses from the synthesized sol–gel materials when exposed to the different gaseous samples.

## 2. Experimental

### 2.1. Reagents and materials

All chemicals used were of analytical-reagent grade.

Cadmium oxide (99.99%), trioctylphosphine oxide (TOPO, 99%), trioctylphosphine (TOP, 90%), selenium (powder, 100 mesh, 99.99%), hexamethyldisilathiane, diethylzinc, anhydrous methanol and anhydrous chloroform were purchased from Sigma–Aldrich (Milwaukee, WI, USA). Hexylphosphonic acid (HPA) was obtained from Alfa Aesar (Karlsruhe, Germany).

Sol–gel silicate precursors tetramethoxysilane (TMOS) and 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES) were from Fluka Chemie (Steinheim, Germany) and N-ethyl-N'-(3-dimethylamino-propyl)carbodiimide hydrochloride (EDC) was purchased from Fluka, Schnelldorf.

### 2.2. Procedures

#### 2.2.1. Synthesis of the polymer-coated ZnS/CdSe quantum dots

ZnS/CdSe QDs were synthesized in our lab using CdO as precursor via the procedure described by Peng's group [9]. Briefly, 1.23 mmol of CdO, 0.6 g of HPA and 17.5 g of TOPO were loaded into a 250 ml glass three-necked flask. The mixture was heated to 300 °C under argon flow for 15–20 min to allow the complete dissolution of CdO in HPA and TOPO. After cooling the temperature of the solution down to 270 °C, 6 ml of the SeTOP solution was swiftly injected and nanocrystals were left to grow for about 7 min at 250 °C. Once the growth process has reached the desirable core size, 7.5 ml of ZnSTOP solution is added slowly at 230 °C in order to allow the generation of the shell, and then is cooled down to 100 °C for an hour. Afterwards the solution is cooled down to room temperature and the QDs solution was transferred to a glass vial and diluted with anhydrous chloroform. Finally, the purification process was done by mixing the QDs solution with methanol, and it was centrifuged at 5000 rpm during 5 min in order to separate the

QDs by precipitation. The supernatant liquid phase was decanted to remove any excess of reagents. The purified QD nanocrystals were then re-dispersed in anhydrous chloroform.

In order to solubilize the nanoparticles in aqueous solution, as well as to perform the entrapment of them into the sol–gels during the sol–gel synthesis procedure, QDs were coated with an amphiphilic polymer, synthesized in the laboratory and based on poly-maleic anhydride functional groups, following a procedure recently described [10]. This solubilization approach provides QDs brighter and more stable than surface-exchanged QDs.

### 2.3. Synthesis of the sol–gel sensing material

The QDs, prepared as described above, have been encapsulated into sol–gel matrices by trapping the nanoparticles into the sol–gel silica matrix during the polymerization process. The sol–gel active phases were prepared, following some modifications of a procedure previously reported by us [11]. For sensor A, 2.5 ml ethanol, 0.5 ml water-soluble QDs, 3.0 ml distilled water, were mixed. After stirring the mixture for about 5 min, 0.75 ml of APTES, 20  $\mu$ l of 0.05 M N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethyl-carbodiimide, 0.75 ml TMOS and 50  $\mu$ l sodium hydroxide 0.1 M were consecutively added. The mixture was allowed to gel for approximately 72 h and to dry at room temperature to constant weight for approximately 2 weeks. The dry xerogel was crunched and fragmented. Particles with diameters between 0.08 and 0.20 mm were selected using different sieves. The same procedure has been used for sensor B, except that 1.12 ml of APTES and 0.38 ml of TMOS were added to the initial mixture for sol–gel polymerization.

#### 2.3.1. Instrumental set-up

All fluorescence data were collected with a Perkin Elmer Model LS50B luminescence spectrometer equipped with a flash Xe arc source. Excitation and emission slits were both set to 5 nm for all the experiments. The QDs-doped sol–gel fragmented particles were directly packed in a conventional Hellma (Mulheim, Germany) flow cell as previously described [12].

All measurements were made at room temperature and atmospheric pressure.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Optical properties of QDs trapped in the sol–gels

After synthesis of the doped sol–gel materials, they were initially exposed to a UV lamp (350 nm) for 2 h before use. Upon irradiation, the brightness from the entrapped QDs was gradually recovered to a stable level, and the stabilized emission profile was similar to that of the colloidal QDs in the original solution. This photoactivation was found to be always necessary and resulted in an increase of the measured luminescence and its stability. Such photoactivation process is well known and has been attributed to different mechanisms such as the photoinduced surface reconstruction of the surface atoms of the nanocrystals. It is known that trap states, caused by defects on the surface of the nanocrystal, produce new energy states which may give rise to a less available radiative recombination of luminescence. Due to this, although the mechanism which explains this photoactivation is not clear yet, it is thought that a reconstruction of the surface atoms of the nanoparticle (or an optimization of surface-ligand passivation) could take place leading to the observed enhancement of the measured luminescence [6].

Fig. 1 shows the observed photoluminescence emission spectra of the QDs once photoactivated, before and after being entrapped into the sol–gel matrix. As can be seen, the nanoparticles retain their optical properties after immobilization. The luminescence

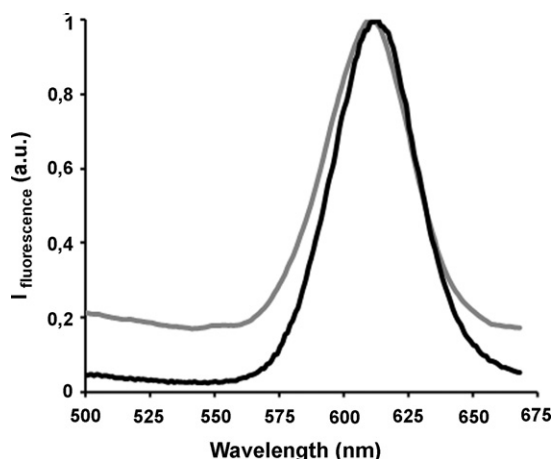


Fig. 1. Photoluminescent spectra of the ZnS/CdSe QDs in solution (black line) and after been immobilized in the sol-gel matrix (grey line).

emission bands, covering a wavelength region range from approximately 575 to 650 nm are rather narrow, thus demonstrating that size distributions are not much different from those observed for the colloidal solutions.

### 3.2. Organic vapors effect

To evaluate the effect of the exposure of the sol-gel-entrapped-QDs to different organic vapors, a conventional flow system designed for gas analysis was used. The target gases were mixed with an argon carrier gas. Ethanol, methanol, chloroform and acetone were used as model organic vapor analytes in this study (all four are examples of VOCs of analytical interest whose presence should be controlled in many workplaces, laboratories, medical rooms and food industry).

The synthesized sol-gel materials doped with the QDs were packed in a conventional flow through cell and the fluorescence signal was continuously measured in a fluorimeter as described in previous papers [13,14]. The analyte vapors were introduced into an exponential dilution chamber provided with a three-way stopcock which allowed the carrier gas (argon) to pass directly to the sensor or to go through the vessel dragging the sample to the sensor [15]. The gas flow rate through the measuring chamber was maintained constant by a rotameter. As discussed before, prior to the organic vapor exposures, the sensor was photoactivated for about 120 min using 350 nm irradiation until a stabilized photoluminescence intensity baseline was achieved at 602 nm.

Two sensing materials were synthesized and used in this work (named sensors A and B). They were made employing the same water-soluble polymer-modified QDs but ensuring a different percentage of the mixture of silica precursors used for encapsulation of the nanoparticles in the silica matrix formed from (3-aminopropyl)triethoxysilan (ATPES) and tetramethoxysilane (TMOS). The difference in the sol-gel doping process resulted in materials with different porosity, that is, the same QDs were entrapped in materials with a slightly different environment.

Fluorescence emission data from the QDs were collected after exposing the two synthesized sol-gel sensing materials (A and B) to the four "model" low molecular weight organic compounds selected (ethanol, methanol, chloroform, and acetone). Each compound was injected in the dilution chamber at three different concentrations and different studies were conducted on different (not necessarily consecutive) days. Vapor response patterns were collected by recording fluorescence intensity of the assessed sensor before, during and after the vapor entrance pulse.

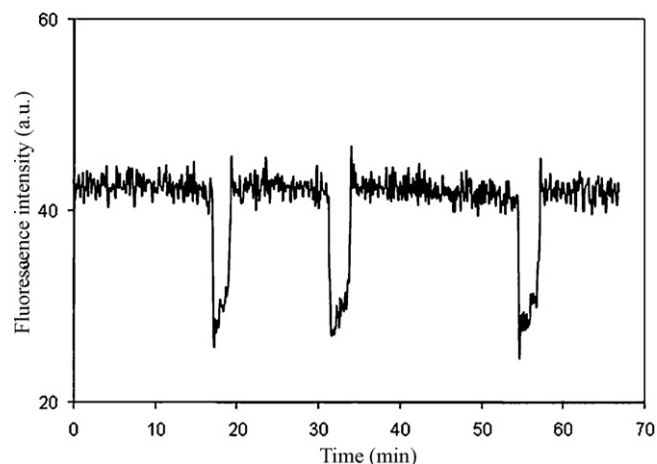


Fig. 2. Fluorescence response of sensor A to repetitive exposures of 6.52 mmol of ethanol.

The recorded fluorescence spectra from the amphiphilic polymer-modified ZnS/CdSe QDs retained on the sol-gel inorganic matrices, before and after organic vapors exposure, showed that the shape and position of fluorescence emission band did not change in the presence of the different analytes, whereas a reversible decrease in fluorescence intensity occurs in the presence of the organic vapors. Fig. 2 shows the effect of three consecutive injections of ethanol vapor on the fluorescence emission from the QDs entrapped in the sol-gel doped material A.

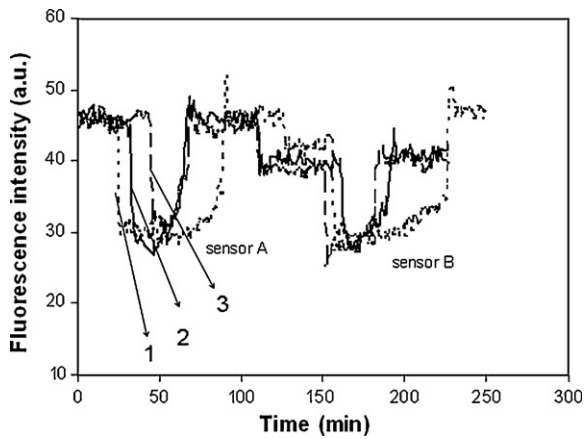
It was observed that the fluorescence intensity from the sol-gels doped with the QDs reversibly decreased upon exposure to increased concentrations of the tested volatile compounds. Linear relationships were found between the fluorescence peak area and the amount of analyte injected in the flow system (with linear regression coefficients better than 0.999). The total response and recovery kinetics of the photoluminescence from the QDs trapped in the sol-gel matrices upon exposure to the organic vapors were rather short (less than 3.5 min for low analyte concentrations and of about 14 min for high analyte concentration exposures).

The fluorescence peak area signal changes, upon exposure of the sol-gel doped material A to the volatile analytes, were highly reproducible, with relative standard deviations (RSD) between 1% and 4% (depending on the nature of the gaseous analyte and on its concentration). Similar RSD values were obtained for signal changes when exposing the sol-gel B to the analytes. Absolute detection limits were estimated according to the IUPAC criteria: working under the optimized experimental conditions it was possible to detect below 1 mmol of each of the tested analytes injected in the dilution chamber.

The observed quenching effect may result from a reversible change in the dielectric environment of the sol-gel, thus affecting the optoelectronic properties of the entrapped ZnS/CdSe QDs [7], as well as from a reversible change in the physical integrity of the sensing material and its corresponding wetting properties when exposed to the different gaseous analytes [3]. Obviously, the different nature of the organic species interacting with the QDs would explain the differences observed in the extent of the changes on the luminescence of the QDs entrapped in the sol-gel when exposed to the different tested gaseous analytes.

On the other hand, the nature of the matrix in which the QDs are immobilized also can contribute to the variable response patterns as shown in Fig. 3. If the same polymer-modified ZnS/CdSe nanocrystals were entrapped inside sol-gel matrices of different compositions (sensing phases A and B), each composite demon-



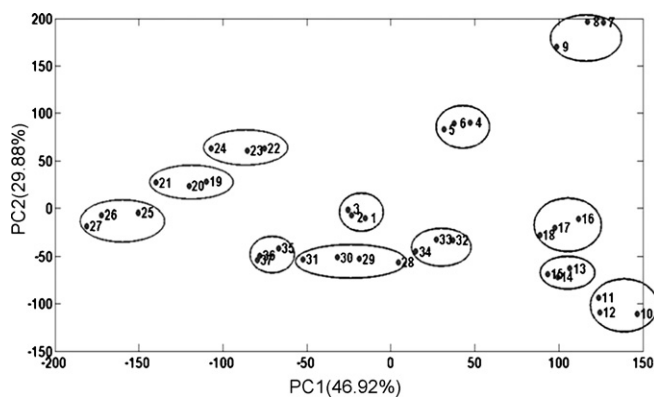


**Fig. 3.** Fluorescence response of sensors A and B to 23.2 mmol of (1) ethanol; (2) methanol; (3) acetone.

strated different photoluminescence reversible response pattern upon exposure to the high and low polar organic vapors. Both sensors A and B exhibited responses having different amplitudes and/or response time frames for each analyte tested. The observed differences on the luminescence response characteristics of the trapped QDs in A and B may be related not only to dielectric medium change surrounding the nanocrystals but also to changes in the porosity of the sol-gel polymeric matrices (due to the different composition of the precursors mixture). This would condition the accessibility of the gaseous analytes to the entrapped QDs and, thus, would create unique sensing regions interacting in a different manner with the organic vapor molecules.

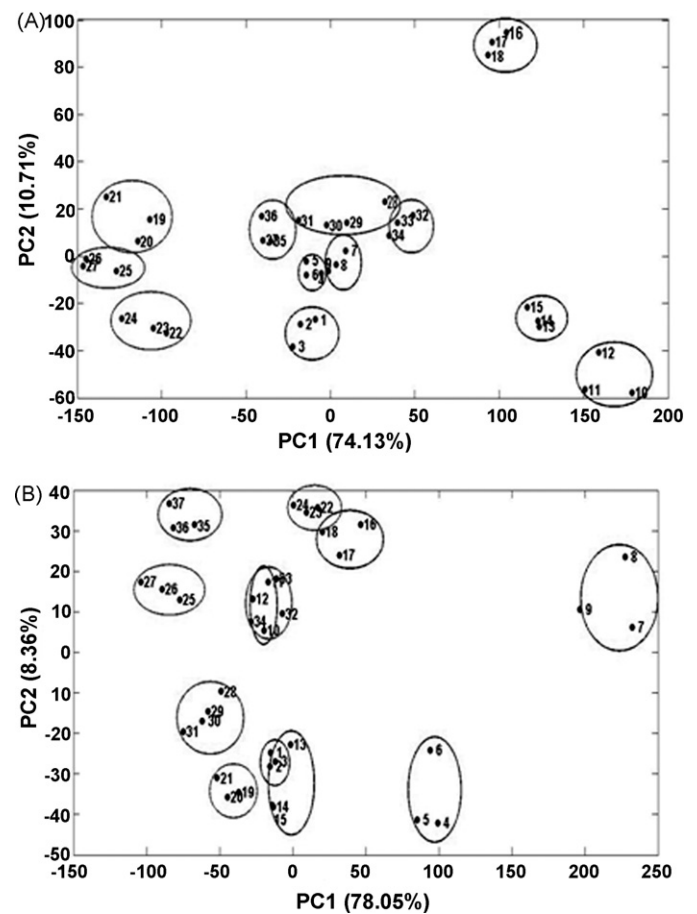
### 3.3. Dynamic pattern recognition

As described before, different temporal and spatial patterns were generated by measuring the luminescence emission from the QDs after exposure of the A and B materials to the four gaseous analytes studied. This behavior implies that, under the selected experimental conditions, application of a relatively simple algorithm based on identifying a solvent vapor through its pattern type would be enough to identify and distinguish between the different vapors studied in this work. A similar approach has been proposed for polymer-based sensing systems [16,17].



**Fig. 4.** PCA score plot of the response of the sensors A and B. Data points in the circles show dynamic response from the replicate exposures of the vapors to sensors. (1–3) 23.26 mmol EtOH; (4–6) 14.34 mmol EtOH; (7–9) 6.52 mmol EtOH; (10–12) 38.12 mmol MeOH; (13–15) 23.43 mmol MeOH; (16–18) 14.34 mmol MeOH; (19–21) 38.02 mmol CHCl<sub>3</sub>; (22–24) 23.20 mmol CHCl<sub>3</sub>; (25–27) 14.32 mmol CHCl<sub>3</sub>; (28–31) 23.10 mmol acetone; (32–34) 14.31 mmol acetone; (35–37) 10.86 mmol acetone.

To establish the ability of nanocrystals embedded in the different composition of sol-gel matrix for discrimination between the organic vapors, we applied the principal component analysis (PCA) technique [18,19]. The dynamic response data of the sensing materials during their repetitive exposures to methanol, ethanol, chloroform, and acetone vapors were then analyzed. PCA is a well-known statistical method for data projection, and widely used in data analysis [19]. By the reduction of data dimensionality, PCA allows their visualization retaining much of the information present in the original data. Gaseous streams containing the volatile species selected were exposed to the synthesized sensors A and B at three different analyte concentrations. Each unique exposure for each single analyte was repeated three times. Therefore, 36 sets of fluorescence–time drive responses were collected for all analytes with each sensor. The four solvents contained 72 total exposures. A total of 140 time points were collected for each sample. The input data for PCA can be represented by a (280 × 37) matrix. PCA calculations used a singular-value decomposition algorithm and were performed with the MATLAB software version 7.0. PCA results indicated that most of the information (up to 84%) was provided by PC1, PC2, and PC3. The graph illustrates the score plot of the PC1 versus PC2 is shown in Fig. 4. The score plot often gives a clear view of how the trends from different components relate to each other and enables to set distinct boundaries between clusters and was used for the classification of the data clusters. Samples in the same sub-



**Fig. 5.** PCA score plot of the response of the (A) sensor A and (B) sensor B. Data points in the circles show dynamic response from the replicate exposures of the vapors to sensors. (1–3) 23.26 mmol EtOH; (4–6) 14.34 mmol EtOH; (7–9) 6.52 mmol EtOH; (10–12) 38.12 mmol MeOH; (13–15) 23.43 mmol MeOH; (16–18) 14.34 mmol MeOH; (19–21) 38.02 mmol CHCl<sub>3</sub>; (22–24) 23.20 mmol CHCl<sub>3</sub>; (25–27) 14.32 mmol CHCl<sub>3</sub>; (28–31) 23.10 mmol acetone; (32–34) 14.31 mmol acetone; (35–37) 10.86 mmol acetone.

groups are grouped together under the same area in the PCA score plot. Samples having divergent numbers are located further apart. From Fig. 4 it is clear that observed responses of the sensors to different vapors were well separated in the PCA space (i.e. specimen data clustered in different regions independent of concentrations). So, an easy discrimination of methanol, ethanol, chloroform and acetone is possible in a given atmospheric gas sample.

The capability for discriminating organic vapors using just the intensity signals obtained from one of the two developed sensing materials was also evaluated with a (140 × 37) data matrix collected for the four analytes. When this data matrix was subjected to PCA, discrimination between four compounds was achieved as illustrated in Fig. 5A and B. As can be seen from Figs. 4 and 5, data analysis using signals from the two sensors (A and B) provided the better discrimination capability due to the more different response profile for each analyte.

#### 4. Conclusions

In summary, polymer-modified ZnS/CdSe quantum dots embedded in a sol-gel matrix proved to be a simple, reliable and reproducible sensing material for organic vapor detection and identification. Through the appropriate variations in the composition of the host matrix, the developed method shows partial selectivity towards exposure to the various volatile compounds. Thus, chemometrics and pattern recognition technique should be used to process the emission signals from the sensing phases after its exposition to gaseous samples potentially contaminated with organic vapors, allows their individual identification and discrimination.

This work represents a first step in the development of a new approach to VOC direct sensing in contaminated atmospheres. In fact, obtained results show high promise for future development of sensitive and selective QD-based luminescent sensors for alcohols and/or other important volatile organic compounds. Additional work still needs to be done to better understand the sensing mechanism and the relationship between the composition and microstructure of the sensor and its sensing performance and properties. Also new ways to improve selectivity of such QD-based sensing materials should be pursued.

#### Acknowledgments

This work was supported by project CTQ2006-02309 (Ministerio de Educación y Ciencia, Spain). Financial support provided by the Ministry of Science and Innovation of Spain for a FPU grant (AP2006-03787), co-financed by the European Social Fund, is gratefully acknowledged.

#### References

- [1] A. Szczurek, P.M. Szecowka, B.W. Licznarski, *Sens. Actuators B: Chem.* 58 (1994) 427.
- [2] P. Jorge, M.A. Martins, T. Trindade, J.L. Santos, F. Farahi, *Sensors* 7 (2007) 3489.

- [3] O.V. Vassiltsova, Z. Zhao, M.A. Petrukina, M.A. Carpenter, *Sens. Actuators B* 123 (2007) 522.
- [4] J.M. Costa-Fernandez, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, *Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 207.
- [5] L. Qu, X. Peng, *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 2049.
- [6] A.Y. Nazzal, L. Qu, X. Peng, M. Xiao, *Nano Lett.* 3 (2003) 819.
- [7] R.A. Potyrailo, A.M. Leach, *Appl. Phys. Lett.* 88 (2006) 134110.
- [8] C.J. Brinker, G.W. Scherer, *Sol Gel Science*, Academic Press, New York, 1990.
- [9] A. Peng, X. Peng, *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001) 183.
- [10] M.T. Fernández-Argüelles, A. Yakovlev, R.A. Sperling, C. Luccardini, S. Gaillard, A. Sanz-Medel, J.M. Mallet, J.C. Brochon, A. Feltz, M. Oheim, W. Parak, *Nano Lett.* 7 (2007) 2613.
- [11] J.M. Costa-Fernández, M.E. Díaz-García, A. Sanz-Medel, *Anal. Chim. Acta* 360 (1998) 17.
- [12] R. Pereiro García, Y.M. Liu, M.E. Diaz-Garcia, A. Sanz-Medel, *Anal. Chem.* 63 (1991) 1759.
- [13] B.S. Vicente de la Riva, J.M. Costa-Fernandez, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, *Anal. Chim. Acta* 395 (1999) 1.
- [14] J. Rodriguez-Fernandez, J.M. Costa-Fernandez, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, *Anal. Chim. Acta* 398 (1999) 23.
- [15] J.M. Costa-Fernandez, M.E. Diaz-Garcia, A. Sanz-Medel, *Anal. Chim. Acta* 360 (1998) 17.
- [16] E. Zellers, S. Batterman, M. Han, S. Patrash, *Anal. Chem.* 67 (1995) 1092.
- [17] J. White, J.S. Kauer, T.A. Dickinson, D.R. Walt, *Anal. Chem.* 68 (1996) 2191.
- [18] B.G.M. Vandeginste, D.L. Massart, L.M.C. Buydens, S. de Jong, P.J. Lewi, J. Smeyers-Webeke, *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics, Part B*, Elsevier Science B.V. Amsterdam, The Netherlands, 1998, pp. 88–104.
- [19] I.T. Jolliffe, *Principal Component Analysis*, 2nd ed., Springer, New York, 2004.

#### Biographies

**M. Hasani** is currently an academic member of Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran. Her research interests are the thermodynamic and kinetic studies of charge transfer complexes and the chemometrics.

**Ana María Coto García** is a Ph.D. Student in Analytical Chemistry at the University of Oviedo. In October 2006, she joined the "Analytical Spectrometry" Research Group (University of Oviedo, Spain) headed by Prof. Alfredo Sanz-Medel. Currently, she is working under the supervision of Dr. Jose Manuel Costa-Fernández and Prof. Alfredo Sanz-Medel on the line of investigation "Photoluminescent chemical sensors based on Quantum Dots".

**José Manuel Costa Fernández** joined the "Analytical Spectrometry" Research Group (University of Oviedo, Spain) headed by Prof. Alfredo Sanz-Medel in September 1994. He obtained there his PhD in Chemistry in 1998. During 1999 he moved for a postdoctoral research position under the supervision of Prof. Gary M. Hieftje at the Department of Chemistry (Indiana University), working in atomic time-of-flight mass spectrometry. He became a lecturer in Analytical Chemistry at the University of Oviedo, in 2000, where he is currently an Associate Professor. He is co-author of more than 60 publications and over 100 communications to international scientific meetings. His research fields include instrumental and applied aspects in optical fiber molecular sensors based on luminescence measurements and in use of semiconductor nanoparticles as luminescent labels for biochemical analysis.

**Alfredo Sanz-Medel** has been Professor of Analytical Chemistry at the University of Oviedo in Spain since 1983. He has been the President of "Grupo Espectroquímico Español" (of the Spanish Royal Society of Chemistry) for ten years, has served on the Editorial Boards of the *J. Anal. Atom. Spectrom.* and *Mikrochim. Acta* and at present is one of the Editors of Analytical and Bioanalytical Chemistry. Alfredo Sanz-Medel is the author or co-author of about 400 research articles and reviews. His research interests are mainly in the development of plasma sources for ultratrace elemental analysis, fiber optic molecular sensors and hyphenated techniques. Applications where a powerful separation technique (HPLC, GC or CE) is coupled with an ICP-MS for elemental speciation or with an "organic-MS" detector for metalloproteins structure and function elucidation are now particularly pursued in his analytical research.



**G.4 CHARACTERIZATION OF PHOTOLUMINESCENCE  
ACTIVATION OF SEMICONDUCTOR NANOPARTICLES  
FOR OPTICAL SENSORS**

M. Valledor, J.C. Campo, F. J. Ferrero, A. M. Coto-García, M. T.  
Fernandez-Arguelles, J. M. Costa, A. Sanz Medel

Nanotechnology, 22 (2011) 385703(9pp)



# Dynamic analysis of the photoenhancement process of colloidal quantum dots with different surface modifications

Marta Valledor Llopis<sup>1,3</sup>, Juan Carlos Campo Rodríguez<sup>1</sup>,  
Francisco J Ferrero Martín<sup>1</sup>, Ana María Coto<sup>2,3</sup>,  
María T Fernández-Argüelles<sup>2</sup>, J M Costa-Fernández<sup>2</sup> and  
A Sanz-Medel<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Ingeniería Eléctrica, Electrónica, C y S Universidad de Oviedo, Campus de Gijón s/n, 33204 Gijón (Asturias), Spain

<sup>2</sup> Departamento de Química Física y Analítica, Universidad de Oviedo, Campus del Cristo, 33006 Oviedo (Asturias), Spain

Received 14 June 2011, in final form 2 August 2011

Published 31 August 2011

Online at [stacks.iop.org/Nano/22/385703](http://stacks.iop.org/Nano/22/385703)

## Abstract

Photoinduced fluorescence enhancement of colloidal quantum dots (QDs) is a hot topic addressed in many studies due to its great influence on the bioanalytical performance of such nanoparticles. However, understanding of this process is not a simple task, and it cannot be explained by a general mechanism as it greatly depends on the QDs' nature, solubilization strategies, surrounding environment, etc.

In this vein, we have critically compared the behavior of CdSe QDs (widely used in bioanalytical applications) with different surface modifications (ligand exchange and polymer coating), in different controlled experimental conditions, in the presence–absence of the ZnS layer and in different media when exposed for long times to intense UV irradiation. Thus six different types of colloidal QDs were finally studied.

This research was carried out from a novel perspective, based on the analysis of the dynamic behavior of the photoactivation process (of great interest for further applications of QDs as labels in biomedical applications).

The results showed a different behavior of the studied colloidal QDs after UV irradiation in terms of their photoluminescence characteristics, potential toxicity due to metal release to the environment, nanoparticle stability and surface coating degradation.

(Some figures in this article are in colour only in the electronic version)

## 1. Introduction

Quantum dots (QDs) are nearly spherical, luminescent nanosized crystals made of semiconductor materials of the order of 2–10 nm diameter, with size-dependent optical properties [1, 2]. A decrease in the crystal size causes an increase in energy shift between the absorbing and the emitting state. High quantum yields, narrow size, tunable emission and high resistance to photobleaching or to chemical degradation

are rendering QDs the preferred fluorescent probes for imaging applications. These nanocrystals offer unparalleled sensitivity and spatial resolution when compared to more conventional organic fluorophores and, when adequately capped, they surpass organic dyes' performance. Such QDs typically have a nanocrystal core with an inorganic capping and an outer organic group (to help further conjugations or functionalization). For instance, a ZnS capped CdS QD is 20 times brighter than rhodamine and at the same time 100 times more stable to photobleaching [3–5]. Moreover, QDs of

<sup>3</sup> These two authors contributed equally to this work.

different sizes can be excited at a single wavelength and emit at multiple wavelengths, allowing their application in multiplexed assays [6]. Due to all these exceptional optoelectronic characteristics, the use of QDs as luminescence probes in bio-imaging has increased significantly since the first examples from Alivisatos' [1] and Nie's [3] groups. The strategies proposed in such pioneering developments solved the problem of water solubilization and bio-compatibility of QDs, opening new avenues for their application in bioanalysis. During the last years QDs have been increasingly used as fluorescent labels in many different bioanalytical applications [7–9].

One of the obstacles limiting the applicability of QDs for biochemical applications is their poorly understood surface chemistry and surface-related processes such as stability and cytotoxicity [10–13]. Also, the rapid rate of quantum dot synthesis (as a result of the high temperature of conventional synthesis procedures,  $-150$ – $300$  °C) is believed to be one of the major reasons for the poor control of the synthesis process and the corresponding low reproducibility of the observed fluorescence intensity.

Additionally, high-quality semiconductor nanoparticles are usually stabilized by organic ligands, such as trioctylphosphine oxide (TOPO). These ligands render the QD hydrophobic, whereas most biochemical applications require water-soluble nanoparticles. The QDs' hydrophobic ligands may be exchanged with bifunctional ligands, such as mercaptoacetic acid, which contains a thiol functional group that binds to the QD surface, allowing the carboxylic acid group to extend away from the QD [3]. The resulting nanoparticle is soluble in aqueous and polar solvents. Alternatively, amphiphilic polymers that contain hydrophilic groups to render water solubility, and hydrophobic alkyl chains to interdigitate with the alkyl chains of QD ligands can be also be used for water solubilization of the nanoparticles [14, 15]. However, a decay of the photoluminescence of the QDs is very often observed after transfer of the functionalized nanoparticles into biological systems (e.g. derived from partial degradation of the QD due to reactions of the semiconductor surface with oxygen).

It is well known that exposure of colloidal QDs to UV or visible light has been shown to offer a powerful tool for increasing their photoluminescence, after their synthesis or further functionalization [16, 17]. Despite intense research into light-induced photoluminescence enhancement of semiconductor nanoparticles during recent years, the mechanism of this process is not yet fully understood [10]. The main reason for this is the fact that various parameters, such as oxygen, water, gaseous molecules, stabilizing agents, or the preparation and stabilization routes of the QDs can influence the nanoparticles during the photoactivation process. In particular, it should be considered that the different strategies for synthesis and water solubilization of QDs modify to different extents the surface of the nanoparticle, and thus it could be expected that this would affect the photoactivation process.

So far, different interpretations for the QD photoenhancement process can be found in the literature [10]. In general, the essence of the photoactivation seems to be elimination of topological surface defects, that is, the smoothing of the

nanoparticle surface during photo-corrosion [18]. On the other hand, adsorbed water molecules may act to help to oxidize the surface of the QDs resulting in a blue-shift of the exciton emission and this would eventually introduce new surface defects decreasing the luminescence. The competition between these two processes should explain the complex behavior of the observed photoenhancement of QDs in aqueous media [12].

In an effort to clarify further such photoactivation processes, determining the final quality of the QDs for photoluminescent applications, here we present a detailed study of photon-induced photoluminescence enhancement of core (CdSe) and core-shell (CdSe/ZnS) quantum dots and of nanoparticle surface modified (functionalized) QDs, using a typical bifunctional molecule (mercaptoacetic acid, MAA QDs) or a capping polymer (using an amphiphilic polymer, PQDs).

## 2. Experimental section

### 2.1. Synthesis of CdSe and CdSe/ZnS QDs

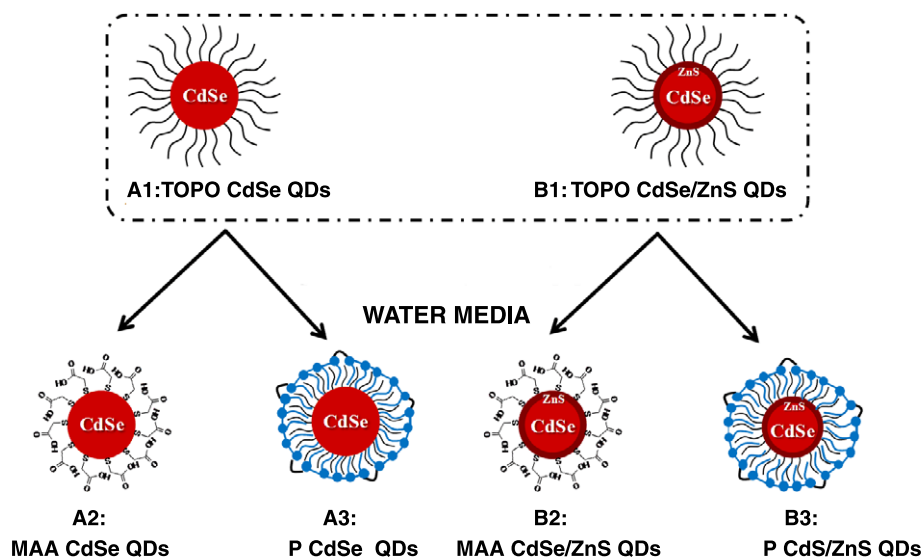
A selenium stock solution was prepared in an Ar-filled dry box by dissolving 14.23 mmol of selenium powder in 7.5 ml of trioctylphosphine (TOP), to produce a solution of trioctylphosphineselenide (SeTOP). Zinc sulfide (ZnSTOP) stock solution was also prepared in Ar atmosphere by mixing 1.23 mmol of hexamethyldisilathiane, 1.75 mmol of diethylzinc and 10.25 ml of TOP.

CdSe/ZnS and CdSe QDs were synthesized using CdO as precursor via the procedure described by Peng's group with some slight modifications [19]. Briefly, 1.23 mmol of CdO, 0.6 g of HPA and 17.5 g of TOPO were loaded into a 250 ml glass three-necked flask. The mixture was heated to 300 °C under argon flow for 15–20 min to allow the complete dissolution of CdO in HPA and TOPO. After cooling the temperature of the solution down to 270 °C, 6 ml of the SeTOP solution was swiftly injected. After injection, nanocrystals were left to grow for about 12 min at 250 °C. Once the growth process had reached the desirable core size, the temperature was lowered to 100 °C for an hour in order to obtain CdSe QDs. On the other hand, to synthesize CdSe/ZnS nanoparticles the temperature was reduced to 230 °C and at this stage 7.5 ml of ZnS/TOP solution was added slowly in order to allow the generation of the ZnS shell, then the solution was cooled down to 100 °C for an hour.

After 1 h at 100 °C, both solutions were cooled down to room temperature and the QD dispersion was transferred to a glass vial and diluted with anhydrous chloroform. Finally, the purification process was carried out by mixing the QD solution with methanol, and it was centrifuged at 5000 rpm for 5 min (in order to separate the QDs by precipitation). The supernatant liquid phase was also decanted to remove any excess of reagents. The purified QD nanocrystals were then re-dispersed in anhydrous chloroform.

### 2.2. Water solubilization via ligand exchange

For the organic surface modification of the nanoparticles, 10 ml of CdSe or CdSe/ZnS QDs in methanol solution was mixed



**Figure 1.** Schematic diagram of the QDs under study with the different surface modifications.

with 1 ml tetrabutylammonium hydroxide and 1 ml of MMA to obtain the mercaptoacetic acid capped nanocrystals [20]. The solution was refluxed for 12 h. After cooling down to room temperature, the modified QDs were then separated and purified from the excess of reagents as previously described and finally dispersed in pH = 12 sodium borate buffer (SBB). Further, filtration of the CdSe–MAA or CdSe/ZnS–MMA QDs through a filter device with 0.22  $\mu\text{m}$  pore size was carried out to eliminate possible aggregated nanoparticles.

### 2.3. Water solubilization via amphiphilic polymer coating

The QDs were coated with an amphiphilic polymer, synthesized in the laboratory and based on poly-maleic anhydride functional groups, following a procedure described recently [21]. About 2 ml of an amphiphilic polymer was placed in a round flask with 100 ml of a 2.8  $\mu\text{M}$  solution of CdSe or CdSe/ZnS quantum dots in anhydrous chloroform and heated to 55–60  $^{\circ}\text{C}$  for approximately 40 s. Afterward, the mixture was stirred in a rotavap system and the solvent was evaporated slowly. Then, 4 ml of 0.02 M bis(hexamethylene)tri-amine in chloroform was added to the dried powder, and the mixture was stirred for  $\sim$ 15 min. The solvent was again evaporated slowly and when the mixture was dry the sample was redissolved in pH 12 SBB. Purification of the polymer coated quantum dots was carried out by filtration through a filter device with 0.22  $\mu\text{m}$  pore size.

### 2.4. The colloidal QDs employed in the photoactivation study

Figure 1 shows schematically the structure of the different QDs used in the assay. Firstly, the synthesized nanoparticles were evaluated in organic media as obtained after the purification process. CdSe (sample A1) and CdSe/ZnS (sample B1) QDs were dispersed in chloroform and stabilized by trioctylphosphine ligands, as coming from the synthesis procedure.

Then, the CdSe and CdSe/ZnS nanoparticles synthesized were both modified for water solubilization following two different approaches: a second group of samples was nanoparticle modified, via ligand exchange, with mercaptoacetic acid (MAA). Thus, CdSe–MAA (sample A2) and CdSe/ZnS–MAA (sample B2) modified with bifunctional molecules (MMA) were dispersed in SBB at pH 12.

Finally, the third group of samples was nanoparticles modified with an amphiphilic polymer, PMA75C12. Again, both CdSe–polymer (sample A3) and CdSe/ZnS–polymer (sample B3) samples were stabilized through the hydrophobic interaction between the original trioctylphosphine ligands and the amphiphilic polymer [21] and then they were dispersed in SBB at pH = 12.

### 2.5. Reagents and solutions

All the chemicals used for QD synthesis and modification were of analytical grade and used as received without further purification. Cadmium oxide (99.99%), trioctylphosphine oxide (TOPO, 97%), trioctylphosphine (TOP, 90%), selenium (powder, 100 mesh, 99.99%), 2-mercaptoacetic acid 97% (MAA), hexamethyldisilathiane (TMS), diethylzinc, anhydrous methanol and anhydrous chloroform were purchased from Aldrich (Milwaukee, WI, USA). Poly(isobutylene-*alt*-maleic anhydride), dodecylamine, bis(hexamethylene)tri-amine and tetrahydrofuran were obtained from Sigma. Hexylphosphonic acid (HPA) and sodium terephthalate were obtained from Alfa Aesar (Karlsruhe, Germany). Tetrabutylammonium hydroxide solution was obtained from Fluka (FlukaChemie GmbH, Steinheim, Germany), and different salts to prepare the buffer solutions used in the study were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Purified and deionized water (Milli-Q Advantage, Millipore) was used in all the experiments.

### 2.6. Radicals assay

We have evaluated the eventual generation of hydroxyl radicals during the UV irradiation process catalyzed by the presence



of the metal nanoparticles in the colloidal suspensions using a fluorimetric assay [22].

A solution of CdSe/ZnS–polymer quantum dots (sample B3) was irradiated with a 365 nm UV light (photoactivation process) in the presence of non-fluorescent disodium terephthalate. If hydroxyl radicals were generated upon photoactivation of the QDs, the generated radicals would react with the non-fluorescent terephthalate to render the fluorescent product 2-hydroxyterephthalate, which emits fluorescence at about 425 nm (after excitation at 320 nm) in the presence of sodium hydroxide. Fluorescence emission spectroscopy was employed to monitor the formation of 2-hydroxyterephthalate (425 nm) using a fixed excitation wavelength of 320 nm.

In the assay 2.5 ml of CdSe/ZnS–polymer (3  $\mu$ M) quantum dots (type B3) were mixed with 2.5 ml of disodium terephthalate (0.1 M in water) and the mixture was photoactivated with a UV lamp ( $\lambda = 365$  nm). Aliquots (500  $\mu$ l) at different time intervals of the mixture were collected and treated with 250  $\mu$ l of NaOH (1 M). Then, the fluorescence was monitored at 425 nm, with an excitation wavelength of 320 nm, which are the maximum emission and excitation wavelengths of the generated 2-hydroxyterephthalate.

### 2.7. ICP-MS measurements

Complementary studies related to the photoactivation process were performed using as a model the QD sample of CdSe/ZnS–polymer (sample B3); inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) measurements were carried out in order to register elemental concentration changes in the quantum dot solutions. If a release of components from the nanoparticles' cores (Zn, Cd, Se) takes place during the photoactivation process nanoparticles could be separated from the solvent by centrifugation (Centrifuge Mini Spin Plus, Eppendorf) using appropriate centrifugal filters. The filter device allows one to obtain separately quantum dot nanoparticles and a solution containing possible metallic compounds generated from nanoparticle degradation. The great accuracy and precision of ICP-MS measurements could shed light on such a degradation processes.

Several aliquots (2 ml) of a dispersion containing type B3 nanoparticles were exposed under continuous UV irradiation for different time intervals (from 0 to 24 h). Once the samples were removed from the thermal chamber, they were centrifuged using a Microcon Ultracel YM-100 to preconcentrate to approximately 0.5 ml and the supernatant was analyzed in the ICP-MS. The nanoparticles have a high molecular weight ( $MW > 100$  kDa), therefore in the centrifugation process they tend to concentrate in the sample reservoir, whereas the buffer excess solution drops to the filtrate vial. The sample preparation for final ICP-MS measurements consists of the dilution of the supernatant (1:5 dilution with 1%  $HNO_3$ ) employing Ga as the internal standard.

### 2.8. Optical instrumentation

UV–vis absorption spectra were recorded on a Lambda 900 Perkin Elmer spectrophotometer using quartz cuvettes.

After the solubilization process the emission spectra of the resulting water-solubilized nanoparticles were recorded on a Varian Cary Eclipse (Varian Iberica) fluorescence spectrophotometer. In addition, the cores of the synthesized quantum dots were calculated according to Peng's equation based on calculations from absorbance and fluorescence data [19]. Also, making use of this empirical equation the concentration of nanoparticles in solution was estimated in all cases by applying the Lambert–Beer law.

The fluorescence signal from 2-hydroxyterephthalate was recorded on a Varian Cary Eclipse (Varian Iberica) fluorescence spectrophotometer using a fixed excitation wavelength of 320 nm with both excitation and emission slit widths of 10 nm.

The photoinduced fluorescence enhancement in colloidal QDs was investigated by monitoring the fluorescence behavior upon continuous illumination with a UV light at controlled constant temperature. In this study, not only the emission intensity, but also the wavelength of the optical emission, should be monitored continuously along the photoactivation process. Lamps (model F4 T5/BLB) were employed to photoactivate the QDs. Two lamps were used in order to achieve a homogeneous distribution of the light to photoactivate the samples. The ultraviolet lamps had a spectral emission peak centered on 370 nm and an emission power of 4.5  $\mu$ W  $cm^{-2}$ . The fluorescence emission and the scattered light emitted by the optical sensor were guided to the spectrometer by an optical fiber. The reception optical fiber was positioned at an angle of 90° to the UV lamp excitation.

The spectrometer used was a model USB2000 from Ocean Optics. The ultraviolet lamps and the QD solutions were introduced in an incubator (model ICP500 from Memmert) and the temperature was set to 20 °C to avoid its influence on the measurements.

The measurement system acquires a spectral response at time intervals specified by software. The time interval was set at 10 min and each of the spectra acquired was stored in a spreadsheet. However, the duration of each photoactivation experiment is from 20 to 200 h depending on the type of nanoparticle. When the photoactivation experiment is finished, all obtained spectra are processed. By combining all spectra in a single graph the evolution of different optical signals is obtained. Moreover, plots showing the peak wavelength and intensity versus time, which are highly useful to better identify the obtained spectral shift and the increase in fluorescence intensity upon photoactivation, are obtained.

## 3. Results and discussion

As mentioned above, we investigated the photoactivation of colloidal solutions of CdSe and of CdSe/ZnS QDs with different surface modifications and under various conditions. As expected, for all the colloidal QDs investigated we observed a significant increase of the fluorescence emission intensity after UV irradiation of the samples.

First, it was verified that the photoactivation was independent of the wavelength of the excitation light. For this purpose, aqueous dispersions of colloidal CdSe/ZnS

**Table 1.** Parameters from the fit of the experimental data of the photoactivation of the colloidal QDs under study.

	$I_m$	$A$	$\tau$ (h)	$\beta$	Time to reach 95% of photoactivation (h)	Peak wavelength variation after $\tau$ (nm)	Peak wavelength variation after $3^{1/\beta}\tau$ (nm)	Increase in luminosity after $3^{1/\beta}\tau$ (%)
A1	4992.45	-4226.45	6.38	0.96	20.04	4.08	8.84	825
A2	13459.94	-13646.47	10.96	1.06	30.90	7.43	12.51	6935
A3	186.28	-41.84	3.10	1.02	9.10	2.02	3.02	4
B1	53737.51	-52137.80	40.4	1.05	115.02	8.77	11.81	3863
B2 <sup>a</sup>	53874.63	-53832.28	7.2	0.71	36.84	1.00	1.00	118317
B3	2006.28	-1381.45	2.20	0.67	11.34	3.05	13.24	209

<sup>a</sup> Fitting after the first 3 h.

PQDs were exposed to xenon discharge lamp radiation (peak power equivalent to 75 kW) at 300, 350 and 400 nm in a Varian Cary Eclipse fluorescence spectrometer (Varian Iberica, Madrid, Spain). These measurements revealed that the photoactivation of the QDs did not strongly depend on the excitation wavelength. Therefore, all further photoactivation experiments were carried out at 370 nm (UV lamp).

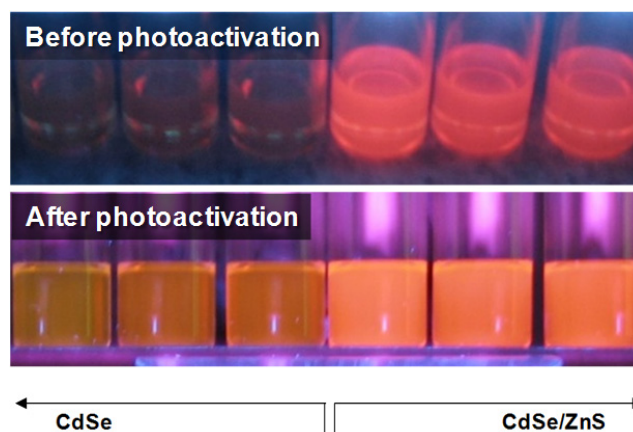
Subsequently, the dependence of the photoactivation on the QD solubilization strategies and on the composition of the semiconductor nanoparticles (CdSe or CdSe/ZnS) was studied. Colloidal dispersions of the synthesized QDs in water, MAA-CdSe QDs, P-CdSe QDs, MAA-CdSe/ZnS QDs, and P-CdSe/ZnS QDs (samples A2, A3, B2 and B3), and chloroform, TOPO-CdSe QDs and TOPO-CdSe/ZnS QDs (samples A1 and B1), were photoactivated by the 370 nm lamp for a time period of several hours (depending on the sample) at room temperature. The photoenhancement of the nanoparticle colloids was investigated in chloroform (for those QDs insoluble in aqueous media) and in an aqueous buffered medium (sodium borate buffer, pH = 12). This aqueous medium was selected because the synthesized QDs are highly stable at such a basic pH.

The dynamic rates of evolution of the fluorescence intensity during the activation period were obtained by fitting the response to a stretched exponential function [23]:

$$I(t) = I_m + Ae^{-(\frac{t}{\tau})^\beta}. \quad (1)$$

Here,  $I$  is the fluorescence intensity,  $I_m$  is the final value of the emission intensity after photoactivation,  $t$  is the activation time,  $A$  is the variation of the emission during the photoactivation (the initial value  $I_0$  minus the final value  $I_m$ ),  $\tau$  is a characteristic time constant of the process, and  $\beta$  is a stretching parameter usually less than 1. The value  $3^{1/\beta}\tau$  is the time to reach 95% of the variation of the emission intensity and allows comparison of the response times of different processes. Jones *et al* used this function for a quantitative description of the photoluminescence enhancement of TOPO capped CdSe/ZnS nanoparticles in different solvents [23]. They assumed that the continuous illumination of the nanoparticles causes an oxidation and subsequently a transformation of the QD surface. The  $I_m$ ,  $\tau$ ,  $A$ , and  $\beta$  parameters were obtained by fitting experimental results (normalized photoluminescence intensity of the QDs as a function of activation time) to equation (1), and they are shown in table 1.

As can be seen, the different QDs showed different photoactivation performances depending on the nature of the



**Figure 2.** Glass vials exposed to a UV light containing colloidal suspensions of CdSe QDs in chloroform (the three vials on the left side of the figure) and CdSe/ZnS QDs in chloroform (the three vials on the right) before and after a photoactivation process.

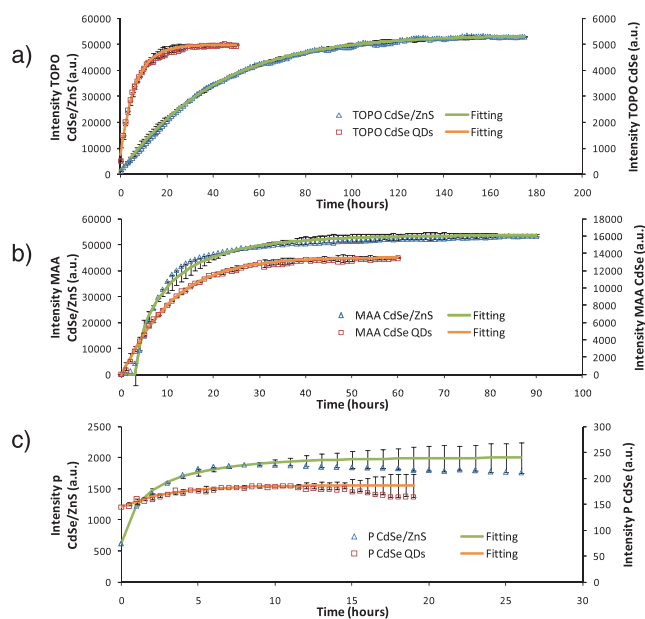
nanoparticle (presence or absence of the ZnS shell), the solvent and the nature of the ligands modifying the core surface. The results obtained clearly show that the ZnS protective shell influences the photoactivation process. As an example, figure 2 shows a picture of glass vials exposed to a UV light containing colloidal suspensions of CdSe QDs and CdSe/ZnS QDs, all in chloroform media without any surface modification, before and after a photoactivation process. As can be seen, an increase of the photoluminescence emission is always observed after photoactivation. However, CdSe/ZnS QDs emit a detectable-by-eye fluorescence even without a previous photoactivation process, while the luminescence from the non-photoactivated CdSe QDs is much weaker. Passivation of QDs with a shell of a semiconductor with higher energy band gap is a well known approach to eliminate surface defects, thus increasing the luminescence quantum yield [10]. Hence, in both organic and aqueous media the photoenhancement of CdSe nanoparticles layered with a ZnS shell is much higher than for those without a shell (see table 1). In organic media (when no organic ligand surface modification of the QDs was performed), the addition of a further step during the nanoparticle synthesis in order to grow a ZnS shell results in QDs requiring longer photoactivation times. Photooxidation is usually considered the main photoactivation mechanism in nonpolar solvents and the shell makes the diffusion of the oxygen to the CdSe

core difficult [10]. Conversely, it was observed that in aqueous media the photoactivation time needed to reach 95% of the intensity variation did not show significant differences when the ZnS shell was present. However, the dynamics of the process was different, since the value of the stretching parameter  $\beta$  was found to be around 0.7 for those nanoparticles with ZnS shells, and around 1 for those without the ZnS layer. A value of  $\beta$  equal to 1 is due to a first order process following a monoexponential evolution. Values of  $\beta$  different from 1 are attributed to a sequence of strongly coupled steps with different rates due to a surface transformation of the CdSe/ZnS nanoparticles [23].

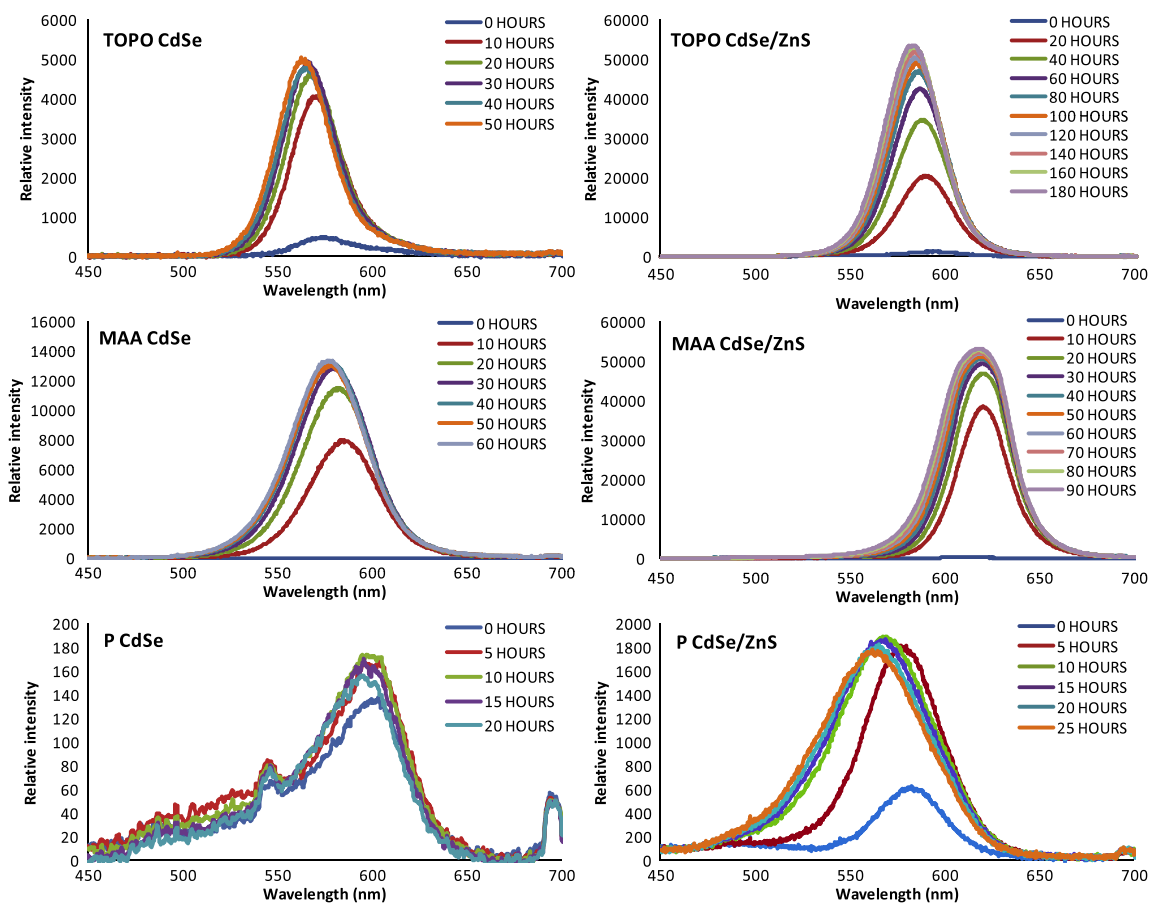
Considering that bioanalytical applications of QDs are performed in aqueous media, next, the following sections summarize the most relevant results obtained by analyzing the dynamics of the photoactivation of the QDs in water.

### 3.1. Dynamics of the photoactivation process of QDs water-solubilized via ligand exchange

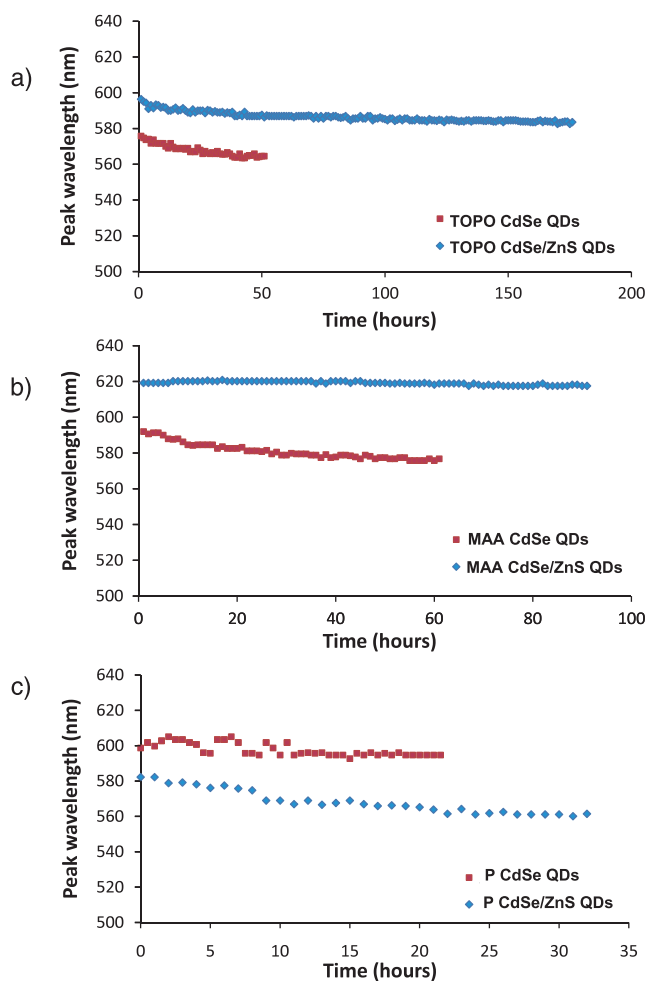
The MAA–CdSe/ZnS QD sample did not show a good fit with equation (1), particularly during the first 3 h of photoactivation where a low photoactivation speed was observed (see figures 3 and 4); fitting the luminescence response of the sample to equation (1) after the first 3 h the value of  $\beta$  was again about 0.7.



**Figure 3.** Comparison of the photoactivation behaviors of the peak wavelengths of core and core/shell QDs: (a) TOPO QDs in  $\text{CHCl}_3$ ; (b) MAA QDs in aqueous solution; (c) polymer coated QDs in aqueous solution. The fitting functions and error bars are shown.



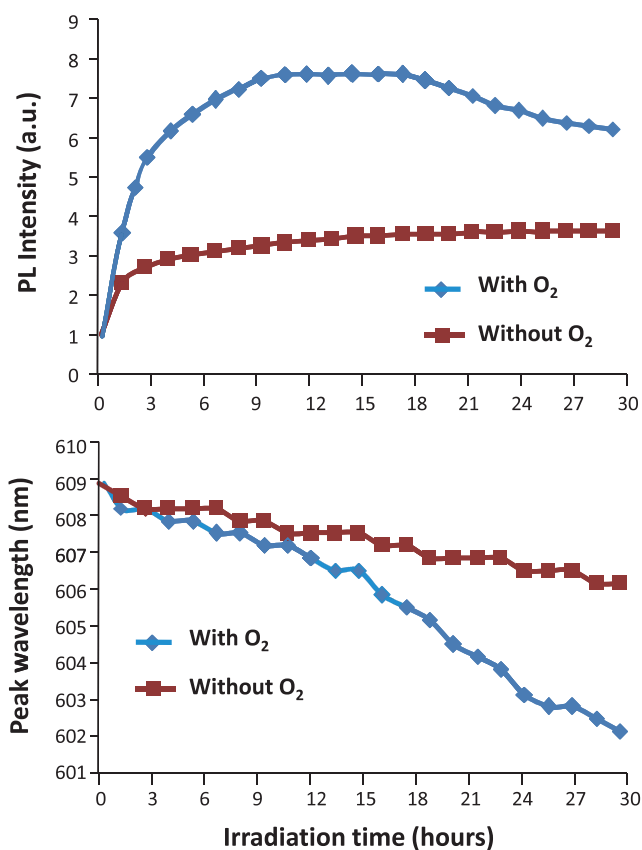
**Figure 4.** Evolution of the fluorescence spectra of core and core/shell QDs (TOPO QDs in  $\text{CHCl}_3$ , MAA QDs in aqueous solution and polymer coated QDs in aqueous solution).



**Figure 5.** Evolution of the maximum emission wavelength of core and core/shell QDs of (a) TOPO QDs in  $\text{CHCl}_3$ ; (b) MAA QDs in aqueous solution; (c) polymer coated QDs in aqueous solution.

Although, as figure 5 shows, QDs having a ZnS shell suffer from a lower spectral blue-shift displacement after complete photoactivation, the variation of the maximum emission intensity as compared to the variation of the maximum emission wavelength until complete photoactivation (see table 1) is noticeable even when the ZnS shell is present except for the CdSe/ZnS–MAA QDs (sample B2). In this sample the highest photoluminescence enhancement detected, the lowest blue displacement observed, the low value of the stretching parameter  $\beta$ , and the initial low photoactivation speed altogether suggest different photoactivation mechanisms for the photooxidation.

The larger bandgap of the additional passivating inorganic shell (ZnS) here provides a protection of the surface against oxidation, and additionally entraps the excitons in the core, resulting in reduced luminescence quenching caused by CdSe surface defects. Furthermore, in particular, Zn-containing shells exhibit a much greater affinity to thiol groups than the mere core material [24]. Both effects could explain the lower diffusion rate of oxygen to the CdSe core (lower initial photooxidation speed) observed for this type of QD.

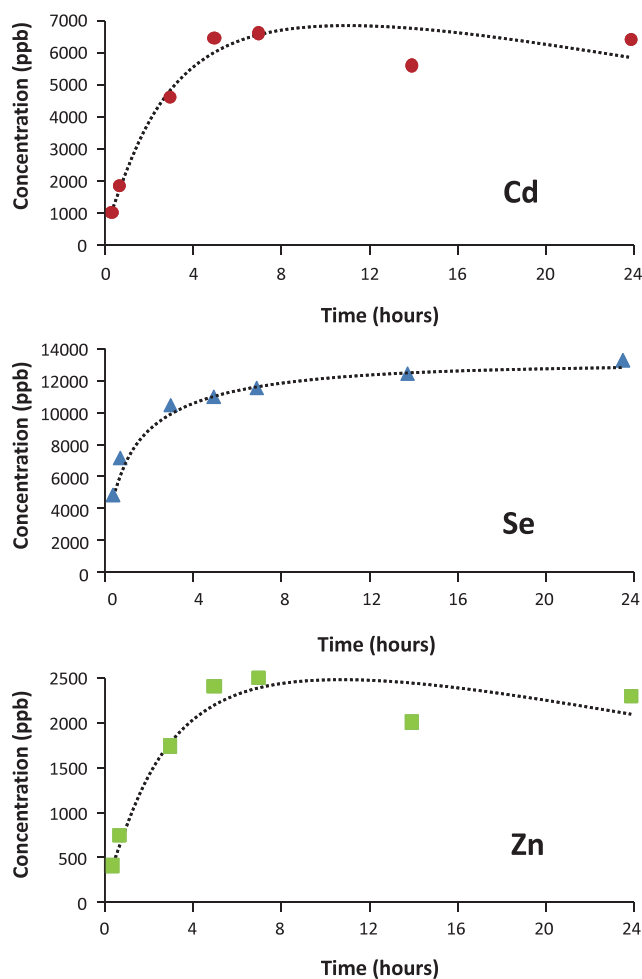


**Figure 6.** Photoluminescence intensity and blue-shift behavior of polymer coated CdSe/ZnS QDs in the presence and absence of dissolved oxygen.

### 3.2. Dynamics of the photoactivation process of QDs water-solubilized via polymer coating

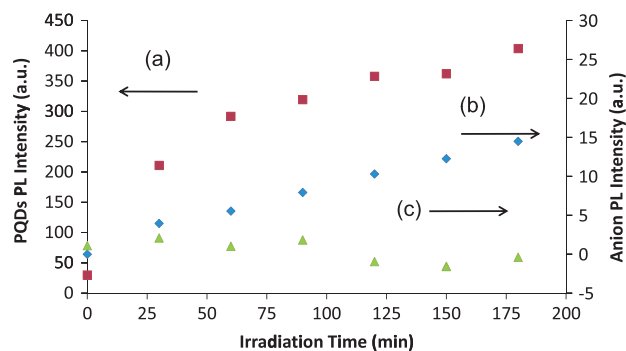
A decrease in the fluorescence intensity after longer exposures to the UV light was observed when working with polymer coated QD samples (both in the presence and absence of a ZnS shell). The observed good agreement of the fitting function to the experimental data and the high blue-shift suggest that the photoactivation of these samples is mainly a result of surface oxidation of the QDs. In order to confirm such a mechanism, polymer modified CdSe/ZnS QDs were continuously irradiated under the UV lamp in water, in the presence of oxygen first and then in the absence of oxygen (here the aqueous samples were deoxygenated by using sodium sulfite) [25]. The results of continuous irradiation, of both oxygenated and deoxygenated colloidal QDs, for 30 h are shown in figure 6. The highest NP photoactivation (as shown by the fluorescence intensity and spectral blue-shift maxima) occurred in the presence of oxygen. QD samples dispersed in deoxygenated solutions showed much lower photoactivation demonstrating the key role of oxygen in the QD photoactivation process.

Preliminary studies demonstrated that a blue-shift of the fluorescence emission spectra often indicates a change in the polarity of the QD environment or, alternatively, the known decrease of the particle size (this latter case would imply a subsequent release of metallic ions from the QD to the



**Figure 7.** ICP-MS measurements of  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Se}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  released from the nanoparticles at increasing irradiation times.

solvent). Generally, after oxidation of the nanoparticle surface a decrease in the QD size takes place due to desorption of  $\text{SeO}_2$  and  $\text{SO}_4^-$ , accompanied by a release of  $\text{Zn}^{2+}$  and  $\text{Cd}^{2+}$  ions to the solution from the nanoparticle surface. In order to further study the surface oxidation role in the photoactivation process, we investigated by ICP-MS the release of Cd, Se and Zn as a function of the QD irradiation time. Thus, colloidal suspensions of CdSe/ZnS PQDs were exposed to continuous UV-radiation and aliquots of the irradiated sample were periodically collected at different times of continuous irradiation. The aliquots were then centrifuged to separate the nanoparticles from the solvent. The concentration of expected released metals could be monitored in the supernatant solution. Thus, the supernatants were tested for free Cd, Se and Zn by ICP-MS and the results observed are shown in figure 7. A significant surface oxidation seems to take place during UV irradiation as increased releases of the three monitored metals are observed as the irradiation time increases. Remarkably, for polymer coated CdSe/ZnS QDs at about 8 h we observed the maximum intensity enhancement and the highest spectral blue-shift. After 8 h the concentration of metals in the supernatants was found to maintain a constant value (apparently the photoactivation process should slow



**Figure 8.** The UV-light irradiation effect on (a) the luminescent emission from PQDs in a colloidal suspension, (b) the luminescent emission from 2-hydroxyterephthalate anions in the presence of colloidal PQDs, (c) the luminescent emission from 2-hydroxyterephthalate anions in the presence of free polymer (the same polymer used for water stabilization of the PQDs) but without PQDs.

down). The fact that a spectral shift was observed during photoactivation and that this comes along with an increase of free QD metal release and an increasing blue-shift indicates that most likely a photooxidation effect could be responsible for such effects.

Finally, as mentioned before, in samples of polymer coated CdSe QDs and of CdSe/ZnS QDs a decrease of their fluorescence emission (after an initial photoactivation by UV light for a long period) was apparent. This could be assigned to a degradation of the polymeric coating, eventually modifying the QDs' surfaces. Possibly the known reactive radical generation by UV irradiation, catalyzed in the presence of QDs [26], could explain such a degradation of the organic polymer. In fact, irradiation of nanocrystalline QDs leads to the formation of reactive oxygen species (ROS) in aqueous solution [26]. Thus, such light-triggered production of ROS could bring about the observed photodecomposition of the aqueous stabilizing polymeric layer of both types of PQDs.

Following this idea, we checked the eventual generation of hydroxyl radicals during the UV irradiation process of a water sample containing CdSe/ZnS PQDs. The possible presence of such hydroxyl radicals was monitored by a fluorimetric assay [22] (following the procedure described in section 2). The PQD solution was irradiated with UV light for photoactivation in the presence of non-fluorescent disodium terephthalate and the fluorescence was measured. The observed results of this study are plotted in figure 7.

Figure 8(a) shows the PQDs' emission intensity variation (measured at the QDs' emission wavelength of 587 nm) upon photoactivation by sample irradiation at 365 nm. As expected, there is an increase in the QDs' emission intensity with irradiation time of the sample (PQDs in the presence of non-fluorescent disodium terephthalate). Moreover, as can be seen in figure 8(b), fluorescent 2-hydroxyterephthalate is simultaneously generated upon irradiation of the QD sample, thus confirming that reactive radicals are actually generated by the UV light. The fluorimetric assay was also performed using a control solution of a sample without QDs but containing

the disodium terephthalate and polymer used for nanoparticle solubilization. As shown in figure 7(c), this control did not show any significant fluorescence indicating no generation of free radicals in the absence of QDs.

In brief, it was observed that the polymer coating shows an appreciable degradation, generated by free radicals, after 8 h of exposure to UV light.

#### 4. Conclusions

The study and interpretation of QD luminescence emission changes during photoactivation processes was found to be useful both to control the synthesis of high-quality nanocrystals, and to obtain valuable information about the surface chemistry of nanoparticles and also the mechanisms involved in surface interaction with the reaction.

In this study, absolutely quantitative data (e.g. photoluminescence intensities, stretching parameters, photoactivation rates, peak wavelength variations, etc) were measured for the different QDs, thus making it simpler to compare the reported results and to select the adequate nanoparticles for a given bioanalytical application.

This study was made from a novel perspective, based on the analysis of the dynamic behavior of the photoactivation process. The results are of great interest for further applications of QDs as labels in biomedical applications because the degradations of a particular type of nanoparticle after long UV irradiation times can be estimated. Experimentally, it was found that the photoactivation process strongly depends on the QD composition (e.g. the presence or absence of a ZnS shell and on the QDs' surface modification). Regarding the dynamics of this process, the results indicated that the process becomes more complex after surface modification, e.g. with mercaptoacetic acid or a polymer, and photooxidation seems to be a major player in the observed photoactivation. The experimental evidence for the photooxidation of the QD during photoactivation is supported by the fact that the particle size decreases (confirmed by the observed spectral blue-shift) and free ion metals are released from the nanoparticles during UV irradiation (the concentration of the free elements increases in the supernatants).

Importantly for bioconjugation applications, QDs modified with polymeric layers resulted in important fluorescence intensity decreases after long irradiation times. This fact can be rationalized in terms of reactive radical formation which would accelerate the organic polymer degradation and so particle aggregation and the corresponding loss of luminescence of the NPs.

#### Acknowledgments

Financial support from the Spanish Ministry of Education and Science (research projects DPI2008-03297 and CTQ2006-

02309) and FEDER program co-financing funds is gratefully acknowledged. Financial support to A M Coto provided by the Ministry of Science and Q4 Innovation of Spain (FPU grant AP2006-03787), co-financed by the European Social Fund, is gratefully acknowledged.

#### References

- [1] Bruchez M Jr, Moronne M, Gin P, Weiss S and Alivisatos A P 1998 *Science* **281** 2013–6
- [2] Alivisatos A P 1996 *Science* **271** 933–7
- [3] Chan W C W and Nie S M 1998 *Science* **281** 2016–8
- [4] Dzhagan V M, Valakh M Y, Raevska O E, Stroyuk O L, Kuchmiy S Y and Zahn D R T 2009 *Nanotechnology* **20** 365704
- [5] Torchynska T V 2009 *Nanotechnology* **20** 095401
- [6] Wagner M K, Li F, Li J, Li X and Le X C 2010 *Anal. Bioanal. Chem.* **397** 3213–4
- [7] Smith Am, Ruan G, Rhyner M N and Nie S 2006 *Ann. Biomed. Eng.* **34** 3–14
- [8] Wang C, Gao X and Su X 2010 *Anal. Bioanal. Chem.* **397** 1397–415
- [9] Parak W J, Gerion D, Pellegrino T, Zanchet D, Micheel C, Williams S C, Boudreau R, Le Gros M A, Larabell C A and Alivisatos A P 2003 *Nanotechnology* **14** R15–27
- [10] Carrillo-Carrion C, Cardenas S, Simonet B M and Valcarcel M 2009 *Chem. Commun.* **35** 5214–26
- [11] Zhang B, Gong X, Hao L, Cheng J, Han Y and Chang J 2008 *Nanotechnology* **19** 465604
- [12] Cordero S R, Carson P J, Estabrook R A, Strouse G F and Buratto S K 2000 *J. Phys. Chem. B* **104** 12137–42
- [13] Derfus A M, Chan W C W and Bhatia S N 2004 *Nano Lett.* **4** 11–8
- [14] Wu X, Liu H J, Liu J Q, Haley K N, Treadway J A, Larson J P, Ge N F, Peale F and Bruchez M P 2003 *Nature Biotechnol.* **21** 41–6
- [15] Zeng R, Zhang T, Liu J, Hu S, Wan Q, Liu X, Peng Z and Zou B 2009 *Nanotechnology* **20** 095102
- [16] Manna M, Scher E C, Li L-S and Alivisatos A P 2002 *J. Am. Chem. Soc.* **124** 7136–45
- [17] Zhelev Z, Jose R, Nagase T, Ohba H, Bakalova R, Ishikawa M and Baba Y 2004 *J. Photochem. Photobiol. B* **75** 99–105
- [18] Dembski S, Graf C, Krüger T, Gbureck U, Ewald A, Bock A and Rühl E 2008 *Small* **9** 1516–26
- [19] Peng Z A and Peng X 2001 *J. Am. Chem. Soc.* **123** 183–4
- [20] Jin W J, Fernández-Argüelles M T, Costa-Fernández J M, Pereiro R and Sanz-Medel A 2005 *Chem. Commun.* **7** 883–5
- [21] Fernández-Argüelles M T et al 2007 *Nano Lett.* **7** 2613–7
- [22] Rajendran V, Lehnig M and Niemeyer C M 2009 *J. Mater. Chem.* **19** 6348–53
- [23] Jones M, Nedeljkovic J M, Ellingson R J, Nozik A J and Rumbles G 2003 *J. Phys. Chem. B* **107** 11346–52
- [24] Hezinger A F E, Teßmar J and Göpferich A 2008 *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **68** 138–52
- [25] Díaz-García M E and Sanz-Medel A 1986 *Anal. Chem.* **58** 1436–40
- [26] Bakalova R, Ohba H, Zhelev Z, Nagase T, Jose R, Ishikawa M and Baba Y 2004 *Nano Lett.* **4** 1567–73



**G.5 THE INFLUENCE OF SURFACE COATING ON THE  
PROPERTIES OF WATER-SOLUBLE CDSE AND  
CDSE/ZNS QUANTUM DOTS**

A. M. Coto-García, M. T. Fernandez-Argüelles, J. M. Costa-  
Fernandez, A. Sanz-Medel, M. Valledor, J. C. Campo, F. Martin

Journal of Nanoparticle Research (**Enviado**)





1

2

3

4

5 **The Influence of surface coating on the**  
6 **properties of water-soluble CdSe and**  
7 **CdSe/ZnS Quantum Dots**

8

9

10

11 Ana María Coto-García, María T. Fernández-Argüelles, José M. Costa-Fernández  
12 and Alfredo Sanz-Medel<sup>(\*)</sup>

13 *Department of Physical and Analytical Chemistry, University of Oviedo*  
14 *Avda. Julian Claveria 8, E-33006, Oviedo, Spain.*

15

16

17 Marta Valledor, Juan C. Campo<sup>(\*)</sup>, Francisco J. Ferrero

18 *Department of Electric and Electronic Engineering, University of Oviedo,*  
19 *Campus de Gijón. 33204 Gijón, Spain.*

20

21

22 <sup>(\*)</sup> corresponding author:

Tel: +34-985103474

23

Fax: +34-985103474

24

Email: asm@uniovi.es

25

URL: <http://www.uniovi.es/analyticalspectrometry/>

26

27

28

## 29 **ABSTRACT**

30 It is well known that ligands coating the surface of luminescent semiconductor nanocrystals  
31 (quantum dots) play an important role in the water-phase preparation, stability and physical  
32 properties of the quantum dots.

33 Here we report on the synthesis and characterization of core (CdSe) and core-shell structured QDs  
34 (CdSe/ZnS) water-stabilized with different mechanisms of surface chemistry: ligand exchange and  
35 polymer coating. Experiments were performed using two typical thioalkyl acids as ligands, namely  
36 mercaptoacetic acid (QDs-MAA) and 2-mercaptoethanesulphonic acid (QDs -MES), and an  
37 amphiphilic polymer (PQDs) based on poly (maleic anhydride) functional groups.

38 The effects of pH (buffer solution), illumination and presence of ions in the quantum dot  
39 environment on the spectroscopic properties of the different synthesized QDs are reported. The  
40 stability of the prepared QDs has been comparatively evaluated aimed to elucidate which surface  
41 chemistry provides the suitable properties in order to be employed as fluorescence labels in  
42 distinct types of applications.

43 The experimental results and conclusions will be useful for the development of sensitive sensors or  
44 assays adopting QDs as fluorescence labels.

45

46

47 **Keywords:** *Quantum dots; Nanoparticles; Luminescence; Nanoparticles*  
48 *characterization; Surface coating.*

49

50

51

## 52 **1. Introduction**

53 QDs possess special optoelectronic properties which are advantageous in many  
54 biomedical applications. When compared to organic dyes, QDs have the attractive  
55 property of a very broad absorption band that gradually increases toward shorter  
56 wavelengths. One of the key features of colloidal semiconductor QDs is that they show a  
57 tunable emission band which depends on its particle size and it is very narrow and  
58 symmetric (the width of the emission peak is mainly determined by QD size distribution).  
59 These properties depend on several factors such as composition, particle size, size  
60 distribution, and surface chemistry. Fluorescence Quantum Yields (QY), decay kinetics  
61 and stability are closely related to the number of dangling bonds at the core particle  
62 surface. Therefore, modification of their surface with inorganic passivation layers and/or  
63 organic capping ligands is usually employed to optimize these attributes (Resch-Genger  
64 et al. 2008).

65 Even though there is a trend to design aqueous-based routes to synthesize QDs, the  
66 highest quality QDs are still obtained with either the organometallic or greener method.  
67 Consequently, the QD surface must be modified in order to render the nanocrystals  
68 soluble in aqueous media and biocompatible while keeping their original optical  
69 properties (Anderson and Chan 2008). According to the literature, there are two main  
70 approaches to accomplish the phase-transfer that convey water solubility to NPs; ligand  
71 exchange and amphiphilic polymer coating (Smith et al. 1998).

72 The ligand exchange strategy is based on the replacement of the original hydrophobic  
73 ligands adsorbed onto the surface of the nanocrystal with bifunctional molecules (Chan  
74 and Nie 1998; Bruchez et al. 1998). These molecules possess one end with a functional  
75 group with a higher affinity towards the nanocrystal surface than the original ligand, such  
76 a thiol group (-SH), which drives the exchange. The other end of the ligand can be for  
77 instance, a carboxyl (-COOH) or sulfonic (-SO<sub>3</sub>H) group, and it will yield the desired  
78 functionality and water solubility to the NPs. At neutral or basic pH, carboxyl and  
79 sulfonic groups are deprotonated, and the negative charge of the nanocrystals produce  
80 electrostatic repulsion between the NPs, thus avoiding particle aggregation (Parak and  
81 Pellegrino 2005). However, this strategy presents a limitation of lack of long term  
82 stability in biological buffers as consequence of the labile bond between the NP surface  
83 and the thiolated ligands, giving rise to a desorption from the surface over time, with the  
84 subsequent aggregation and precipitation of the NPs (Chan et al. 2002). The ligand  
85 exchange approach is often carried out with silanes, which act as silica precursors, and

86 some authors consider it as a third strategy called silica coating or surface silanization  
87 (Parak et al. 2003; Liz-Marzan et al. 1996).

88 The second general strategy to produce water-soluble NPs is the use of amphiphilic  
89 polymers containing polar and non-polar subunits. The water solubilization approach is  
90 based on the interaction of hydrophobic alkyl chains of the polymer with the alkyl chains  
91 of surface ligands. Consequently, the hydrophilic groups are located on the external side  
92 of the shell rendering water solubility to the NPs (Pellegrino et al. 2004; Fernandez-  
93 Argüelles et al. 2007). This method retains the native surface ligands from the synthesis  
94 of the nanoparticle, thus keeping many of their photophysical properties unmodified.  
95 However, the final size is increased from three to four times larger than the original  
96 particles, which can be a disadvantage for certain applications (Mazumder et al. 2009).

97 In general terms, prediction of the effect of the environment or surface functionalization  
98 on the optical properties of QDs is a complex task. Usually, excitation and emission  
99 spectra are not as much affected by surface modification as the fluorescence QY and  
100 decay behavior. However, some factors of the microenvironment, such as matrix polarity  
101 and proticity (hydrogen bonding ability), viscosity, pH and ionic strength as well as the  
102 presence of surfactants, fluorescence quenchers such as oxygen, or conjugated molecules,  
103 can have a strong influence on these optical parameters (Resch-Genger et al. 2008).

104 Besides, it is known that buffer chemical compositions can induce QD colloidal  
105 instability due to modifications on the surface charge or chemistry, giving rise to partial  
106 or complete aggregation of the QDs, which is a disadvantage that is limiting some  
107 applications (Anderson and Chan 2008). In this sense, long-term stability of ligand-QDs  
108 is one of the key problems for certain purposes like biomedical labeling or light-emitting  
109 diodes, and therefore, researchers are making a big effort to understand the stability of  
110 nanocrystal-ligand complexes (Aldana et al. 2005; Mekis et al. 2003).

111 In the present work the high-quality CdSe and CdSe/ZnS QDs have been synthesized  
112 employing different surface chemistries for water stabilization. The stability and physical  
113 properties of the different synthesized water soluble nanocrystals have been evaluated and  
114 critically compared trying to get a better understanding of how ligands could affect the  
115 stability and optical properties of the colloidal QDs.

116 The effects of pH (buffer solution), illumination (e.g. several hours) or the storage of the  
117 colloidal solutions over long-term periods will be tested.

118 Such research will provide useful information to improve the understanding of how to  
119 store or to extend the on-shelf QDs lifetimes, benefit long-term in-field applications of  
120 QDs or for the development of sensitive sensors or assays adopting QDs as fluorescence  
121 labels.

122

123

## 124 **2. Materials and methods**

### 125 **2.1. Chemicals**

126 All chemicals used for QD synthesis and modification were of analytical grade and used  
127 as received without further purification. Cadmium oxide (99.99%), trioctylphosphine  
128 oxide (TOPO, 97%), trioctylphosphine (TOP, 90%), selenium (powder, 100 mesh,  
129 99.99%), 2-mercaptoethanesulphonic acid sodium salt 98% (MES), 2-mercaptoacetic acid  
130 97% (MAA), hexamethyldisilathiane (TMS), diethylzinc, anhydrous methanol, anhydrous  
131 THF and anhydrous chloroform were purchased from Aldrich (Milwaukee, WIS,USA).  
132 Poly (isobutylene-alt-maleic anhydride), dodecylamine, bis (hexamethylene)triamine and  
133 tetrahydrofuran were obtained from Sigma. Hexylphosphonic acid (HPA) was obtained  
134 from Alfa Aesar (Karlsruhe, Germany). Tetrabutylammonium hydroxide solution were  
135 from Fluka (Fluka Chemie GmbH, Steinheim, Germany), and different salts to prepare  
136 buffer solutions used in the study were purchased from Merck (Darmstadt, Germany).  
137 Purified and deionized water (Milli-Q Advantage, Millipore) was used in all the  
138 experiments.

139

### 140 **2.2. Synthesis of CdSe/ZnS Quantum Dots**

141 CdSe/ZnS QDs were synthesized using CdO as precursor via the procedure described by  
142 Peng's group (Peng and Peng 2001). For this purpose, a selenium stock solution was  
143 prepared in an Ar-filled dry-box by dissolving 1.62 mmol of selenium powder in 7.5 mL  
144 of TOP, to produce a solution of trioctylphosphine selenide (SeTOP). Zinc sulfide  
145 (ZnSTOP) stock solution was also prepared in Ar atmosphere by mixing 1.23 mmol of  
146 hexamethyldisilathiane, 1.75 mmol of diethylzinc and 10.25 mL of TOP.  
147 Briefly, 1.23 mmol of CdO, 0.6 g of HPA and 17.5 g of TOPO were loaded into a 250  
148 mL glass three-necked flask. The mixture was heated to 300 °C under argon flow for 15–  
149 20 min to allow the complete dissolution of CdO in HPA and TOPO. A heating mantle  
150 with energy heater control (Jp Selecta, Barcelona, Spain) with simultaneous stirring was  
151 employed. To keep a constant argon atmosphere inside the flask, a needle with argon  
152 flow was used. This flow was set to 25 mLmin<sup>-1</sup> by means of a rotameter (Serv'  
153 Instrumentation, Irigny, France). After cooling the temperature of the solution down to  
154 270 °C, 6 mL of the SeTOP solution was swiftly injected. After injection, nanocrystals  
155 were left to grow for about 7 min at 250 °C. Once the growth process has reached the  
156 desirable core size, 7.5 mL of ZnSTOP solution is added slowly at 230 °C in order to

157 allow the generation of the shell, and then is cooled down to 100 °C for an hour.  
158 Afterwards the solution is cooled down to room temperature and the QDs solution was  
159 transferred to a glass vial and diluted with anhydrous chloroform. Finally, the purification  
160 process was done by mixing the QDs solution with methanol, and it was centrifuged at  
161 5000 rpm during 5 min in order to separate the QDs by precipitation. The supernatant  
162 liquid phase was decanted to remove any excess of reagents. The purified QD  
163 nanocrystals were then re-dispersed in anhydrous chloroform.  
164

## 165 **2.3. Water solubilization approaches**

### 166 *2.3.1. Water solubilization via ligand exchange*

167 For the organic surface modification of the nanoparticles, 10 mL of CdSe/ZnS QDs in  
168 methanol solution containing 1 mL tetrabutylammonium hydroxide and 0.3 g MES to  
169 obtain the sulphonic capped nanocrystals, or 1 mL of MAA to obtain the mercaptoacetic  
170 capped nanocrystals. The solution was refluxed for 12 h. After cooling up to room  
171 temperature, the modified QDs were then separated and purified as previously described  
172 and finally dispersed in Sodium Borate Buffer (SBB) pH 12. Further purification of the  
173 QD-MES and QD-MAA was done by filtration through a filter device with 0.22 µm pore  
174 size (Fernandez-Argüelles et al. 2005).  
175

### 176 *2.3.2. Water solubilization via amphiphilic polymer coating*

177 For the synthesis of the amphiphilic polymer, 3.084 g of poly(isobutylene-alt-maleic  
178 anhydride) were placed in a round flask. All the solvents employed for the synthesis of  
179 this polymer were anhydrous, in order to avoid the presence of water in the medium,  
180 which would have caused subsequent opening of the anhydride rings. In another flask,  
181 2.70 g of dodecylamine were dissolved in 100 mL of anhydrous tetrahydrofurane. This  
182 solution was added as quickly as possible under constant stirring to the polymer powder.  
183 This mixture was sonicated for several seconds, and heated to 55-60 °C for 1 hour.  
184 Afterwards, the solution was pre-concentrated to about one third of the original volume in  
185 a rotation-evaporation system in order to enhance the reaction between the polymer and  
186 the amine. Once the sample has been concentrated, it was left stirring overnight. Then the  
187 solvent was slowly evaporated by using the rotavap system until the amphiphilic polymer  
188 was completely dried. Finally, the amphiphilic polymer was re-dissolved in 25 mL  
189 anhydrous CHCl<sub>3</sub> with a resultant concentration of 0.8 M monomers.

190 Solubilization approach based on the use of amphiphilic polymers was carried out as  
191 follows: ~2 mL of amphiphilic polymer were placed in a round flask with 100 mL of a  
192 2.8  $\mu\text{M}$  solution of CdSe/ZnS QDs in anhydrous chloroform and heated up to 55-60  $^{\circ}\text{C}$   
193 for approximately 40 s. Afterwards, the mixture was stirred in a rotavap system and the  
194 solvent was evaporated slowly. Then, 4 mL of 0.02 M bis(hexamethylene)triamine in  
195 chloroform were added to the dried powder, and the mixture was stirred for ~15 min. The  
196 solvent was again evaporated and when the mixture was dry, the sample was re-dissolved  
197 in pH 12 SBB. Purification of the polymer coated QDs was done by filtration through a  
198 filter device with 0.22  $\mu\text{m}$  pore size (Fernandez-Argüelles et al. 2007).

199

## 200 **2.4. Quantum Dots characterization**

### 201 *2.4.1. UV-VIS absorbance and fluorescence emission spectroscopy of* 202 *QDs*

203 UV-Vis absorption spectra were recorded at room temperature on a Lambda 900 Perkin  
204 Elmer Spectrophotometer. Fluorescence spectra were recorded on a Varian Cary Eclipse  
205 (Varian Iberica) fluorescence spectrophotometer using a fixed excitation wavelength of  
206 350 nm with both an excitation and emission slit width of 10 nm. All measurements  
207 were carried out using quartz cuvettes. Rhodamine 6G was used as a standard for  
208 determining PL quantum yields (QYs).

209 After solubilization process the emission spectrum of the resulting water solubilised QDs  
210 were recorded on a Varian Cary Eclipse (Varian Iberica) fluorescence spectrophotometer.  
211 In addition, the core of the synthesized QDs was calculated according to Peng's equation  
212 based on calculations from absorbance and fluorescence data (Yu et al. 2003). Also  
213 making use of this empirical equation the concentration of nanoparticles in solution was  
214 estimated in all cases applying Lambert-Beer law.

215

### 216 *2.4.2. Time Correlated Single Photon Counting (TCSPC)*

217 Photoluminescence decays were obtained with time resolved measurements, using time-  
218 correlated single photon counting (TCSPC) technique, with a Horiba Jobin Yvon  
219 FluoroLog 3 spectrofluorometer. A diode laser emitting at 375 nm was used for  
220 excitation. Detection wavelength was fixed at the maximum emission wavelength for  
221 each sample.

222



### 223 2.4.3. *Microscopy images*

224 Fluorescence micrographs of QD solutions were observed with a fully motorized  
225 Olympus BX61 fluorescence microscope equipped with 4x, 10x, 20x, 40x, 100x  
226 objectives; with fluorescence filters UV (BP 360-370) and a DP71 color digital camera.

227

228 Transmission electron microscopy (TEM) experiments were carried out with JEOL-  
229 2000EX II high resolution electron microscope to obtain high-resolution images of  
230 individual QDs. Samples were prepared by placing one drop of a dilute solution of QDs  
231 in methanol onto a copper grid supporting a thin plastic film and then removing the  
232 remaining solvent in about 2 minutes with the help of a hot air flux.

233

## 234 **3. Results and discussion**

235

### 236 **3.1. Influence of pH on fluorescence intensity and colloidal stability** 237 **of the water-soluble QDs**

238 In order to evaluate the surface modification that generates QDs more stable and less  
239 affected by pH medium, the intensity of the fluorescence emission from different buffered  
240 solutions containing water solubilised CdSe and CdSe/ZnS QDs was measured and  
241 critically compared.

242 The QDs under evaluation were synthesised in our laboratory, all of them with a core of  
243 CdSe or with a core-shell of CdSe/ZnS, and both types surface-modified following two  
244 different approaches: ligand exchange and amphiphilic polymer coating.

245 The synthesised water-soluble nanocrystals were dispersed in different pH buffers (SBB  
246 50 mM pH 12 and pH 9; PBS 50 mM pH 7.4; and HAc/NaAc 50 mM pH 5) at 1  $\mu$ M  
247 nanoparticle concentration (obtained according to Peng's equation (Yu et al. 2003)).

248 Fluorescence signals of the so-prepared QDs were recorded under the same instrumental  
249 conditions ( $\lambda_{exc}$ = 350 nm), excitation/emission slits 10/10 nm, photomultiplier voltage=  
250 600 V).

251 As can be seen in Figure 1A, a continuous reduction on the luminescence emission of the  
252 different CdSe QDs was observed when decreasing the pH, (this effect was found to be  
253 particularly important in the case of the sulphonic-modified CdSe QDs).

254 Fluorescence emission from the QDs is a consequence of the generation of an exciton  
255 when they are irradiated with UV light. Therefore, luminescence observed comes from  
256 the CdSe core, and it is significantly affected by the environment. When QDs are coated

257 with a shell of another semiconductor with similar band gap, such as ZnS, the CdSe core  
258 is highly protected, and therefore, they emit a more intense luminescence, which is  
259 expected to be more stable and less affected by pH or surface chemistry. However, as  
260 seen in Figure 1B, even when CdSe core QDs were synthesized with a protective shell of  
261 ZnS, the fluorescence intensity was also significantly affected by the pH of the medium,  
262 probably due to protonation/deprotonation processes in the surrounding layers of the  
263 shell. This phenomenon affects the QD colloidal stability with the resulting decrease on  
264 the observed luminescence emission signal.

265 As it can be seen in Figure 1B, the maximum fluorescence intensity of core/shell QDs  
266 modified with mercapto acetic acid via ligand exchange, CdSe/ZnS-MAA, was achieved  
267 at pH 7.4, whereas the maximum intensity for the mercaptoethanesulphonic acid capped  
268 QDs, CdSe/ZnS-MES, was acquired in a range between pH 9 and 7.4. Thus, such  
269 nanoparticles exhibit an intense luminescence emission in a pH range typical of the  
270 biological media. This fact is important when planning to use these QDs as fluorescent  
271 labels for bioanalytical applications.

272 Moreover, a drastic decrease on luminescence was observed, in both cases, in acid  
273 medium.

274 Trying to understand such behaviour, it should be noted that interaction between the  
275 surface ligands and cations on the QD surface can be considered like a special  
276 coordination bond. In case of CdSe/ZnS-MES and CdSe/ZnS-MAA, hydrogen ions from  
277 the surrounding medium compete with the ligands for the surface of the nanocrystals  
278 (Aldana et al. 2005). Therefore, at low pH values, a significant ligand release from the  
279 surface of the QD can be expected as a consequence of a displacement reaction, which  
280 destroys the solution homogeneity and causes nanoparticle aggregation. Desorption of  
281 thiolated ligands leads to a decrease of the overall negative charge of the nanoparticles,  
282 reducing the electrostatic repulsion between nanoparticles. Thus, aggregation of  
283 CdSe/ZnS-MAA and CdSe/ZnS-MES can take place spontaneously (Mekis et al. 2003).

284 As the desorption of the surface ligands takes place, large nanoparticle aggregates are  
285 generated, and when they reach certain size they precipitate, leading to a decrease on the  
286 luminescence recorded. Besides, detachment of surface ligands might also cause possible  
287 cytotoxic problems, making the nanocrystals extremely toxic (Mekis et al. 2003).

288 Conversely, at basic pH media the binding affinity toward Zn is more favourable, due to  
289 deprotonation of the thioalkyl acid group (pKa around 10.3 and 10.5 for MAA and MES  
290 respectively), which becomes negatively charged, and endeavours the coordination  
291 between the ligands and the semiconductor surface giving rise to an improvement in  
292 nanoparticle dispersibility and higher quantum yield (as it will be discussed later in  
293 section 3.4).

294 Similarly, polymer-coated QDs show similar behaviour with the pH both using QDs of  
295 CdSe with and without the ZnS shell. In both cases the maximum fluorescence intensity  
296 is achieved at pH 12 and it decreases as lowering the pH of the environment. Moreover,  
297 studies carried out in our laboratory, using chromatography separation and UV-VIS and  
298 fluorimetric detection, showed that a gradual loss on the polymer from the nanoparticles  
299 might take place, particularly at low pH values, and this could explain the decrease of the  
300 luminescence. Such observed effect could be assigned to a degradation of the polymeric  
301 coating due to the generation of reactive hydroxyl radicals when the polymer is irradiated  
302 by UV light for long periods (after 8 hours exposed to UV light). In section 3.5 of the  
303 present manuscript, a detailed description of this finding is included.

304 In addition, it is known that bonds between surrounding polymeric ligands and the  
305 nanoparticle surface are not strong (it is just based on a hydrophobic interaction), and  
306 dissociation and re-coordination of ligands to the QD surface in solution is a dynamic  
307 process. Therefore, aggregates detected are usually a result of a dynamic equilibrium.  
308 According to this knowledge, it is worth mentioning that previous studies carried out in  
309 our laboratory demonstrated that QDs are not affected by pH when they were  
310 immobilized inside a solid sol-gel matrix (Coto-García et al. 2009), and losses of the  
311 surface ligands are less likely to occur due to the solid net surrounding the nanocrystals.  
312 Additionally, colloidal stability was evaluated by using a fluorescence microscope.  
313 Recorded images of different QD solutions are shown in Figure 2. As can be seen, the  
314 CdSe/ZnS QDs recently synthesised and in chloroform media are not aggregated, since  
315 single blinking QDs can be observed. However, after ligand exchange procedure (for  
316 water-solubilization), an important amount of CdSe/ZnS-MAA and CdSe/ZnS-MES  
317 present large aggregates of nanocrystals at all the pHs evaluated. Conversely, such  
318 aggregation problems are not apparently observed when recently synthesised CdSe/ZnS-  
319 polymer QDs are observed under the microscope, even several months after modification  
320 via amphiphilic polymer. This is probably due to the fact that the polymer coating  
321 modification process retains the original surface ligands, thus avoiding partial aggregation  
322 that takes place during the ligand exchange procedure. Besides the hydrophobic  
323 interactions between the alkyl chains of the polymer with the hydrophobic surface  
324 ligands, the polymer coating structure is also sealed with a crosslinker reagent, which  
325 provides higher colloidal stability to the final structure, especially when compared to  
326 ligand exchange modified QDs, where dissociation and re-coordination of ligands occurs.

327

### 328 **3.2.Effect of the nanoparticles coating on the luminescence lifetimes**

329 Further, it was evaluated the eventual effect of the different ligands or polymers used to  
330 stabilize and water-solubilize the QDs on the fluorescence lifetimes of the nanoparticles.  
331 For such purpose, fluorescence lifetimes of the different QDs under investigation were  
332 measured using a time-correlated single photon counting (TCSPC) technique as described  
333 in the experimental section.

334 After excitation of the colloidal QDs by short pulse of the laser, the excited state of the  
335 QD typically decays with a multi-exponential time course, although good behaviour was  
336 also observed when the data were fitted to monoexponential curves. Thus, the average  
337 lifetime obtained from the monoexponential fitting was used to compare the different  
338 samples.

339 When the different water solubilisation approaches of CdSe/ZnS QDs are compared,  
340 similar luminescent lifetimes are obtained for those solubilized with MAA (33 ns) and  
341 polymer coated CdSe/ZnS (25 ns).

342 Moreover, results show that the addition of a ZnS shell is critical when the CdSe QDs are  
343 dispersed in aqueous solution. In this sense, higher lifetimes are measured when the  
344 nanocrystal is protected with a ZnS shell (from 15 ns without shell to 33 ns with ZnS  
345 shell for MAA QDs, and 17 ns without shell to 25 ns with ZnS shell for polymer-QDs).  
346 This fact can be attributed to a bigger influence of the environment on core CdSe QDs  
347 compared to core/shell CdSe/ZnS QDs, which are less affected by the surrounding  
348 medium. The ZnS shell partially prevents photooxidation of the core surface, allowing  
349 higher QD lifetimes. This effect is less critical when the QDs are dispersed in chloroform,  
350 where the presence of dissolved oxygen is much lower.

351

### 352 **3.3. Long-term stability of the different water soluble QDs**

353 Typically, conventional organic fluorophores suffer from limited luminescence stability.  
354 Alternatively semiconductor QDs are more robust and show longer durability which  
355 makes them an interesting alternative. However, they are still affected by the  
356 environment, and there is not still an agreement in the selection of the best conditions to  
357 achieve the best performance of the QDs. Thus, we have evaluated the signal stability of  
358 the different surface modified QDs under continuous irradiation for routine analysis  
359 conditions, at different pHs.

360 Therefore, stability studies were performed solubilising the synthesised QDs at different  
361 pHs by using the same buffers employed for previous experiments. For this purpose, QDs  
362 were exposed to continuous irradiation at an excitation wavelength of 350 nm with a Xe  
363 flash lamp on a Varian Cary Eclipse spectrofluorimeter for sixty minutes. Fluorescence

364 emission was recorded at room temperature and results are shown in Figure 3. As it can  
365 be observed, CdSe/ZnS-MAA and CdSe/ZnS-MES QDs (in the figure it is shown the  
366 behaviour at pH=7.4, but similar effect has been found for the other evaluated pHs) suffer  
367 from a continuous decrease on the signal with irradiation time. Conversely, CdSe/ZnS-  
368 Polymer QDs present a hardly noticeable decrease of the luminescence when irradiated  
369 under the same conditions, even at the lowest pH tested. Hence, it was found that  
370 luminescence photostability of the polymer coated QDs is higher than those modified via  
371 ligand exchange.

372 The long-term colloidal stability of QDs (stored at room temperature and in the absence  
373 of light) was also tested. Results obtained showed that polymer coated QDs are stable  
374 even four months after their surface modification, which indicates that they can be stored  
375 during long periods of time without significant losses on their luminescence performance.  
376 Conversely, nanocrystals modified via ligand exchange with bifunctional molecules are  
377 aggregated just after only two weeks after their surface modification (e.g. they appear  
378 precipitated at the bottom of the vials in aqueous buffers). Figure 4 shows transmission  
379 electron microscopy pictures of QDs-MAA and QDs-P taken 1 month after synthesis. As  
380 can be seen the most stable QDs are, once more, those modified with an amphiphilic  
381 polymer (there is not any detectable nanoparticle aggregation).

382 Moreover, the behaviour of the intensity of the emission of the studied QDs with changes  
383 in the pH was also registered four months after synthesis. Figure 5 shows that polymer  
384 modified QDs show a small decrease on the luminescence emission intensity and a  
385 similar behaviour at different pHs even after four months of aqueous solubilisation.  
386 Conversely, QDs solubilised via ligand exchange suffered from a dramatic decrease on  
387 the luminescence due to an important aggregation with time, particularly important at low  
388 pHs.

389

### 390 **3.4. Effect of the quantum dots coating on the luminescence**

#### 391 **Quantum Yields (QY)**

392 It is known that PL properties of QDs are intimately related to the surface environment of  
393 the nanocrystals, since low PL quantum yields (QYs) are attributed to surface states  
394 located in the band gap of the QDs, which act as trapping states for the photogenerated  
395 charges (Qu and Peng 2002). Such surface states are present as consequence of the  
396 dangling bonds of some surface atoms, and therefore, it is expected that modifications of  
397 the surface of the NPs produce drastic changes on PL QYs.

398 In the present work, QYs of QDs were measured according to the comparative method  
399 (Lakowicz 2006), which involves the use of well characterised standard samples with

400 known fluorescence quantum yield values. For this purpose, Rhodamine 6G in ethanol  
401 was chosen as reference standard (QY = 95 %), and QD solutions with different  
402 concentrations were used for these measurements. Integrated fluorescence intensities,  
403 which means the area of the photoluminescence spectra, were calculated from the fully  
404 corrected fluorescence spectrum obtained at  $\lambda_{ex}=480$  nm, which is the maximum  
405 excitation wavelength of the Rhodamine 6G employed as standard. Then, QYs were  
406 estimated according to the Equation 1, where the subscripts R denote standard  
407 (Rhodamine 6G) and test samples, respectively, Q is QY, I is the integrated fluorescence  
408 signal, OD is the optical density and  $\eta$  is the refractive index of the solvent.

409

$$Q = Q_R \frac{I OD_R \eta^2}{I_R OD \eta_R^2}$$

410

411

Equation 1

412 Test samples with identical absorbance at the same excitation wavelength can be assumed  
413 to absorb the same number of photons. Hence, a simple ratio of the integrated  
414 fluorescence intensities of the two solutions, standard and QD, recorded under identical  
415 conditions will provide the ratio of the quantum yield values, summarized in Table 1.

416 Apart from CdSe/ZnS in  $\text{CHCl}_3$ , QYs were evaluated at two different pH values, such as  
417 pH 12, where it is known that QDs present excellent spectroscopic properties, and pH 7.4,  
418 due to the potential of QDs to be used as biomarkers in biological assays that are  
419 performed in PBS.

420 QY from TOPO capped CdSe/ZnS QDs directly diluted in chloroform, which were not  
421 treated for surface modification has a value around 11 %. However, the  
422 photoluminescence spectrum of CdSe/ZnS-Polymer at pH 12 showed that their QY is  
423 much higher than the same QDs in chloroform. Without taking into account any  
424 photoenhancement effect, QY of CdSe/ZnS-Polymer at pH 12 can reach a value as high  
425 as 19 %. However, unfortunately such QY has radically decreased to a 3 % when  
426 CdSe/ZnS-Polymer undergoes a buffer exchange to pH 7.

427 In case of QDs solubilized via ligand exchange, CdSe/ZnS-MES or CdSe/ZnS-MAA, QY  
428 values are 8 % and 6 % respectively when they are dispersed in basic medium;  
429 furthermore, QYs are even lower at pH 7.4. This decrease on QY might be attributed to  
430 the fact that solubilization of QDs via ligand exchange is a more aggressive process,  
431 where the number of dangling bonds or defects on their surface can be increased after the  
432 ligand exchange procedure. Thus, since this layer is not eliminated or changed during the  
433 polymer coating process, the better QY value of CdSe/ZnS-Polymer compared to  
434 CdSe/ZnS-MES or CdSe/ZnS-MAA can be linked to the retention of the original  
435 protective layer constituted by organic compounds, such as TOPO, TOP or HPA.

436 In general terms, QYs are always better at higher pHs, due to the deprotonation pKa of  
437 the thiol group which are anchoring to the nanoparticle surface. When pH is lower, thiol  
438 groups start to be protonated, and the dynamic equilibrium is displaced to the desorption  
439 of the surface ligands, giving rise to nanocrystals with a less passivated surface, and as  
440 consequence, the photoluminescence properties, including QYs are worse than when such  
441 QDs are dispersed in buffers with higher pH.

442

### 443 **3.5. Photoactivation effect**

444 Several authors described a photoactivation phenomenon of colloidal QDs, also known as  
445 photoenhancement or photobrightening, which can take place under different conditions  
446 (Carrillo-Carrion et al. 2009; Yuan et al. 2008; Oda et al. 2007). A variety of models have  
447 been proposed to explain the observed increase on luminescent intensity with light  
448 exposure, such as adsorption of water molecules or reactive oxygen species acting to  
449 passivate surface states. Unfortunately, the distinct materials available to synthesize QDs,  
450 the variety of synthesis methods, and also the different strategies employed to modify the  
451 surface chemistry lead to discrepancies in the mechanism elucidation.

452 Trying to elucidate the importance of importance of the photoactivation on the QDs under  
453 investigation and the eventual effect of the different solubilisation approaches on the  
454 photoactivation processes, photoinduced fluorescence enhancement of the QDs was  
455 investigated by monitoring fluorescence behavior upon continuous illumination with a  
456 UV light (370 nm) at controlled constant temperature. In this study, not only the emission  
457 intensity, but also the wavelength of the optical emission was monitored continuously  
458 along the photo-activation process.

459 When QDs were modified by the ligand exchange method with mercaptoacetic acid  
460 (CdSe/ZnS-MAA QDs) and dispersed in water at basic pH (as seen before, synthesized  
461 QDs are highly stable at such basic pH media) maximum intensity signal was obtained  
462 after about thirty hours of continuous illumination (see Figure 6), along with a blue-shift  
463 displacement on the emission spectra maximum. The fact that particle size decreased  
464 (confirmed by the observed spectral blue-shift) is in agreement with literature and it  
465 seems to confirm that photooxidation seems to be a major player in observed  
466 photoactivation. Moreover, the same study was performed in the absence of oxygen, and  
467 no significant increase on the luminescence intensity was observed. Thus, QD surface  
468 attack by dissolved oxygen seems to bring about oxidation of the semiconductor  
469 nanoparticle surface and in this way the QD surface should be smoothed and surface  
470 defects eliminated (increase on the luminescence emission).

471 Moreover, the different QDs showed different photoactivation performance depending  
472 also on the nature of the ligands modifying the core surface. In fact, the polymer coated  
473 QDs shows a rather different photoactivation behavior. Observed passivation of these  
474 nanoparticles by UV light irradiation show two clearly separated steps (see Figure 6): an  
475 important increase on the QDs fluorescence emission in the first step and apparent core  
476 degradation is showed in the final step.

477 QDs of CdSe/ZnS with a polymer-coating show an exponential increase in the  
478 fluorescence intensity during the first six irradiation hours. This behaviour can be  
479 ascribed again to a photooxidation effect. In addition, the exponential increase on the  
480 intensity takes place together with a broadening and blue-shift of the emission spectrum  
481 of QDs, associated to a decrease on the particle size as consequence of the gradual  
482 erosion of the QD surface. Besides, it has been reported that some polymers could  
483 partially polymerize under UV light due to cross-linking reactions, producing an static  
484 passivation of the surface defects by polymer molecules, and thus, giving rise to a  
485 luminescence increase (Bol and Meijerink 2001).

486 Later, a small decrease of their fluorescence emission (after an initial photoactivation by  
487 UV light for a long period) was apparent. This could be assigned to a degradation of the  
488 polymeric coating, eventually modifying the QDs surface. Possibly the known reactive  
489 radicals generation by UV irradiation, catalyzed in the presence of QDs could explain  
490 such degradation of the organic polymer.

491

## 492 **4. Conclusions**

493 A comparative evaluation of the behaviour of colloidal water-soluble QDs was carried  
494 out. QDs with a CdSe core and CdSe:ZnS core/shell metallic structure, with different  
495 surface coatings for water solubilization, were comparatively evaluated.

496 It was observed that luminescence of QDs is significantly affected by the pH medium,  
497 and the degree of influence strongly depends on the surface coating of the nanocrystals. It  
498 has been proven that despite luminescence from QDs modified via ligand exchange is less  
499 influenced by pH, their colloidal stability is much lower, since part of the nanoparticles  
500 are aggregated and tends to precipitate only few days after their surface modification due  
501 to partial desorption of the surface ligands.

502 Conversely, nanoparticles modified via interaction with an amphiphilic polymer present  
503 much higher colloidal stability, and fewer aggregation problems even at acidic pH and  
504 several months after their modification is performed.

505 Moreover, the fluorescence behaviour of the nanoparticles upon UV photoactivation of  
506 nanoparticles strongly depends on the surface-modification of the QDs. QDs surface-



507 modified by the ligand exchange method require rather long irradiation times to obtain an  
508 intense and stable luminescence signal. Conversely, polymer coated quantum dots exhibit  
509 an important increase on the QDs fluorescence emission in the first step followed by  
510 significant core degradation in the final step.

511

## 512 **5. Acknowledgements**

513 Financial support from project CTQ2006-02309/BQU (Spanish Ministry of Science and  
514 Innovation cofinanced by the EU FEDER Programme) is gratefully acknowledged. A. M.  
515 Coto-Garcia acknowledges a FPU grant AP2006-03787, awarded by the Ministry of  
516 Science and Innovation of Spain.

517

## 518 **6. References**

519 Aldana J, N Lavelle, Y Wang, X Peng (2005) Size-dependent dissociation pH of thiolate ligands  
520 from cadmium chalcogenide nanocrystals. *J. Am. Chem. Soc.* 127: 2496-2504

521 Anderson R E, W C W Chan (2008) Systematic investigation of preparing biocompatible, single,  
522 and small ZnS-Capped CdSe quantum dots with amphiphilic polymers. *ACS Nano* 2:1341-1352

523 Bol A A, A Meijerink (2001) Luminescence Quantum Efficiency of Nanocrystalline ZnS:Mn<sup>2+</sup>.  
524 2. Enhancement by UV Irradiation. *J. Phys. Chem. B* 105, 10203-10209

525 Bruchez M, M Moronne, P Gin, S Weiss, A P Alivisatos (1998) Semiconductor Nanocrystals as  
526 Fluorescent Biological Labels. *Science*, 281:2013-2016

527 Carrillo-Carrion C, S Cardenas, B M Simonet, M Valcarcel (2009) Quantum dots luminescence  
528 enhancement due to illumination with UV/Vis light. *Chem. Commun.* 35:5214-5226

529 Chan W C W, D J Maxwell, X Gao, R E Bailey, M Han, S Nie (2002) Luminescent quantum dots  
530 for multiplexed biological detection and imaging. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13:40-46

531 Chan W C W, S Nie (1998) Quantum Dot Bioconjugates for Ultrasensitive Nonisotopic Detection.  
532 *Science* 281: 2016-2018

533 Coto-García A M, M T Fernandez-Argüelles, J M Costa-Fernández, A Sanz-Medel (2009)  
534 Entrapment of quantum dots in sol-gel matrices to develop sensing material based on fluorescence  
535 resonance energy transfer. *Chem. Commun.* 36:5454-5456

- 536 Fernandez-Argüelles M T, A Yakovlev, R A Sperling, C Luccardini, S Gaillard, A Sanz-Medel, J  
537 Mallet, J Brochon, A Feltz, M Oheim, W J Parak (2007) Synthesis and characterization of  
538 polymer-coated quantum dots with integrated acceptor dyes as FRET-based nanoprob-  
539 Lett. 7:2613-2617
- 540 Fernandez-Argüelles M T, W J Jin, J M Costa-Fernandez, R Pereiro, A Sanz-Medel (2005)  
541 Surface-modified CdSe quantum dots for the sensitive and selective determination of Cu(II) in  
542 aqueous solutions by luminescent measurements. Anal. Chim. Acta 549:20-25
- 543 Lakowicz J R (2006) Principles of Fluorescence Spectroscopy, Third edition, Springer
- 544 Liz-Marzan L M, M Giersig, P Mulvaney (1996) Synthesis of Nanosized Gold–Silica Core–Shell  
545 Particles. Langmuir 12:4329-4335
- 546 Mazumder D R S, M K Mitra, S Mukherjee, G C Das (2009) Biofunctionalized Quantum Dots in  
547 Biology and Medicine. J. Nano Mater. 2009:1-17
- 548 Mekis I, D V Talapin, A Kornowski, M Haase, H Weller (2003) One-Pot Synthesis of Highly  
549 Luminescent CdSe/CdS Core–Shell Nanocrystals via Organometallic and “Greener” Chemical  
550 Approaches. J. Phys. Chem. B, 107: 7454-7462
- 551 Oda M, J Tsukamoto, A Hasegawa, N Iwami, K Nishiura, I Hagiwara, N Ando, H Horiuchi, T  
552 Tani (2007) Photobrightening of CdSe/ZnS/TOPO nanocrystals. J. of Luminescence 122:762-765
- 553 Parak W J, D Gerion, T Pellegrino, D Zanchet, C Micheel, S C Williams, R Boudreau, M A Le  
554 Gros, C A Larabell, A P Alivisatos (2003) Biological applications of colloidal nanocrystals.  
555 Nanotechnology 14:R15.
- 556 Parak W J, T Pellegrino, C Plank (2005) Labelling of cells with quantum dots. Nanotechnology  
557 16:R9
- 558 Pellegrino T, L Manna, S Kudera, T Liedl, D Koktysh, A L Rogach, S Keller, J Rädler, G Natile,  
559 W. J. Parak (2004) Hydrophobic Nanocrystals Coated with an Amphiphilic Polymer Shell: A  
560 General Route to Water Soluble Nanocrystals. Nano Lett. 4:703-707
- 561 Peng Z A, X Peng (2001) Formation of High-Quality CdTe, CdSe, and CdS Nanocrystals Using  
562 CdO as Precursor. J. Am. Chem. Soc. 123:183-184
- 563 Qu L, X Peng (2002) Control of Photoluminescence Properties of CdSe Nanocrystals in Growth.  
564 J. Am. Chem. Soc. 124:2049-2055
- 565 Resch-Genger U, M Grabolle, S Cavaliere-Jaricot, R Nitschke, T. Nann (2008) Quantum dots  
566 versus organic dyes as fluorescent labels. Nat. Methods 5:763-765

- 567 Smith A M, H Duan, A M. Mohs, S Nie (1998) Bioconjugated Quantum Dots for In Vivo  
568 Molecular and Cellular Imaging. *Adv. Drug Deliver. Rev.* 60:1226-1240
- 569 Yu W W, L Qu, W Guo, X Peng (2003) Experimental Determination of the Extinction Coefficient  
570 of CdTe, CdSe, and CdS Nanocrystals. *Chem. Mater.* 15:2854-2860
- 571 Yuan C T, W C Chou, D S Chuu, Y N Chen, C A Lin, W H Chang (2008) Photoinduced  
572 fluorescence enhancement in colloidal CdSeTe/ZnS core/shell quantum dots. *Appl. Phys. Lett.*  
573 92:183108
- 574

575

## 576 LEGENDS OF FIGURES

577

578 **Fig. 1** Effect of pH on luminescence intensity of different surface coated CdSe (1A) and CdSe/ZnS  
579 (1B) QDs.

580 **Fig. 2** Pictures of CdSe/ZnS QDs in organic (A) and aqueous solvents (B) obtained by  
581 fluorescence microscopy.

582 **Fig. 3** Luminescence emission stability of QDs versus time at pH 7.5, with different surface  
583 coatings.

584 **Fig. 4** Transmission electron microscopy pictures of colloidal water-soluble QDs taken 1 month  
585 after synthesis. A) QDs-MAA; B) QDs-P

586 **Fig. 5** Evolution of the behavior of the luminescence emission of polymer-coated QDs with pH 7  
587 days after synthesis and after 4 months stored in the dark at room temperature.

588 **Fig. 6** Comparison of the photoactivation behavior of core/shell QDs a) MAA QDs b) polymer  
589 coated QDs.

590

591

592

593

## 594 LEGENDS OF TABLES

595

596 **Table 1** Estimated QYs of CdSe/ZnS QDs in different experimental conditions.

597

598

599

600

601

602

603

604

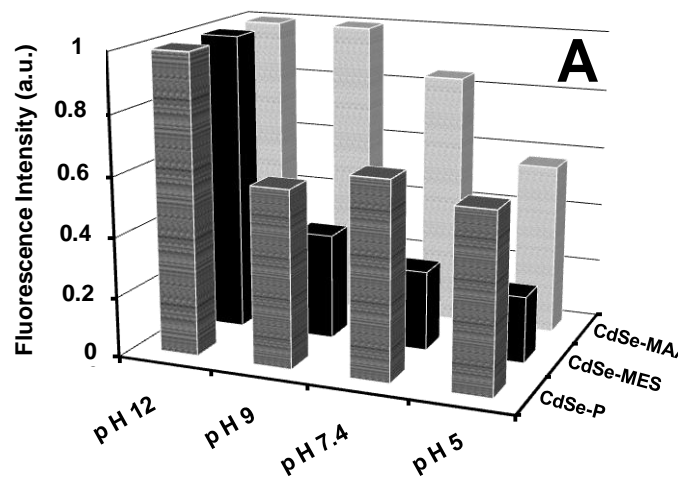
605

606

607

## 608 FIGURES

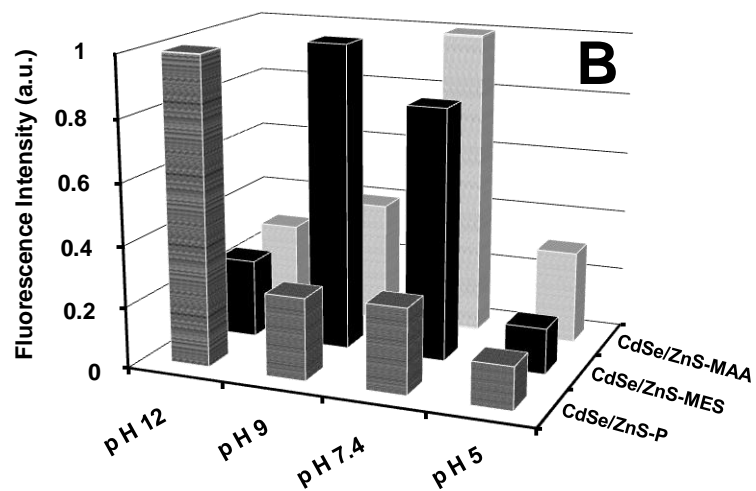
609



610

611

612



613

614

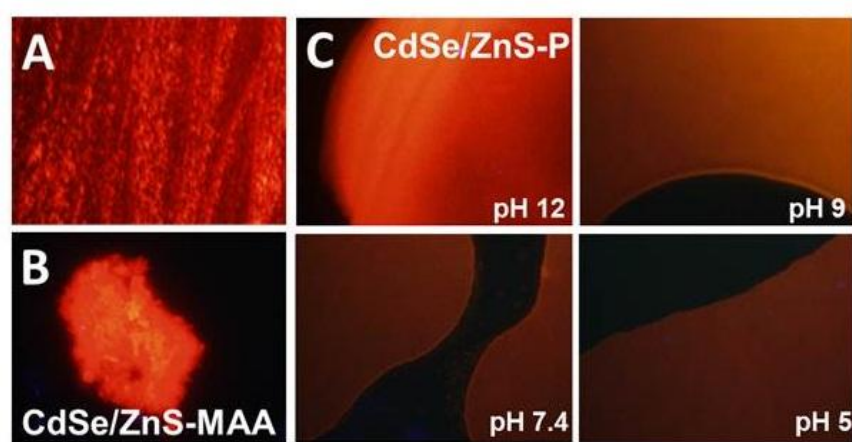
615

616

617

**FIGURE 1**

618  
619  
620  
621  
622  
623  
624  
625  
626  
627  
628  
629  
630  
631



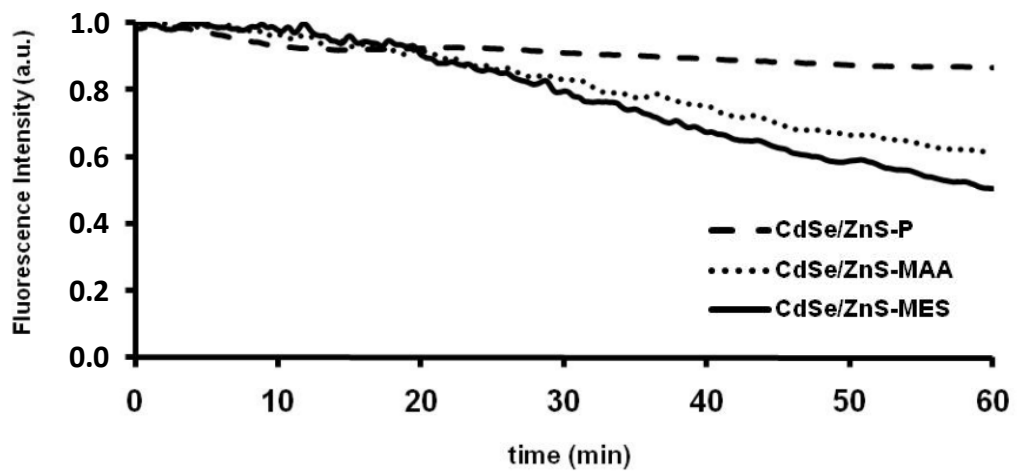
632  
633  
634  
635  
636  
637  
638  
639  
640  
641  
642  
643  
644

645

**FIGURE 2**

646  
647  
648  
649  
650  
651  
652  
653  
654  
655  
656

657  
658  
659  
660  
661  
662  
663  
664  
665  
666  
667  
668

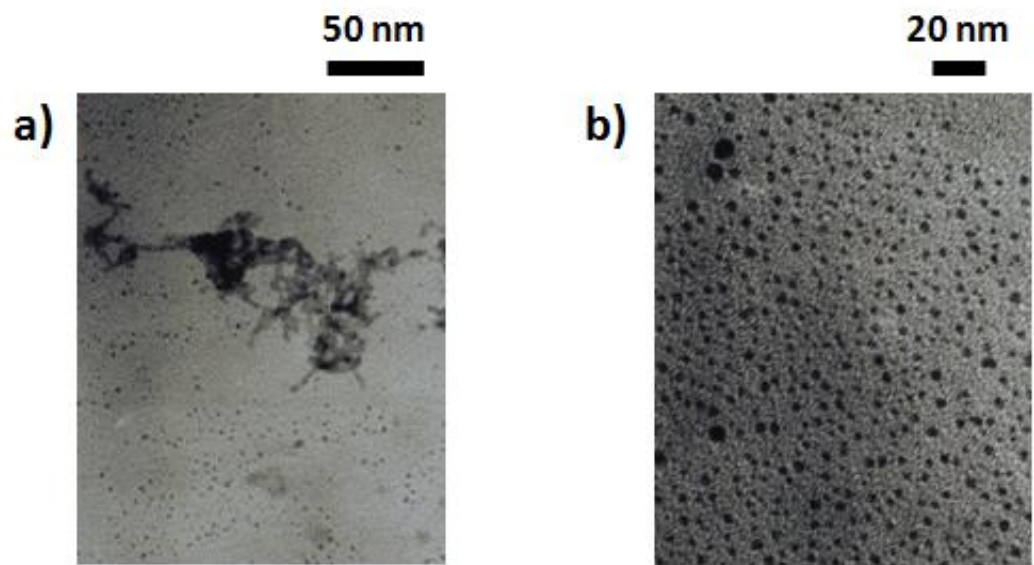


669  
670  
671  
672  
673  
674  
675  
676  
677  
678

**FIGURE 3**

679  
680  
681  
682  
683  
684  
685  
686  
687  
688  
689  
690

691  
692  
693  
694  
695  
696  
697  
698  
699  
700  
701  
702  
703



704  
705  
706  
707  
708  
709  
710  
711  
712  
713

714

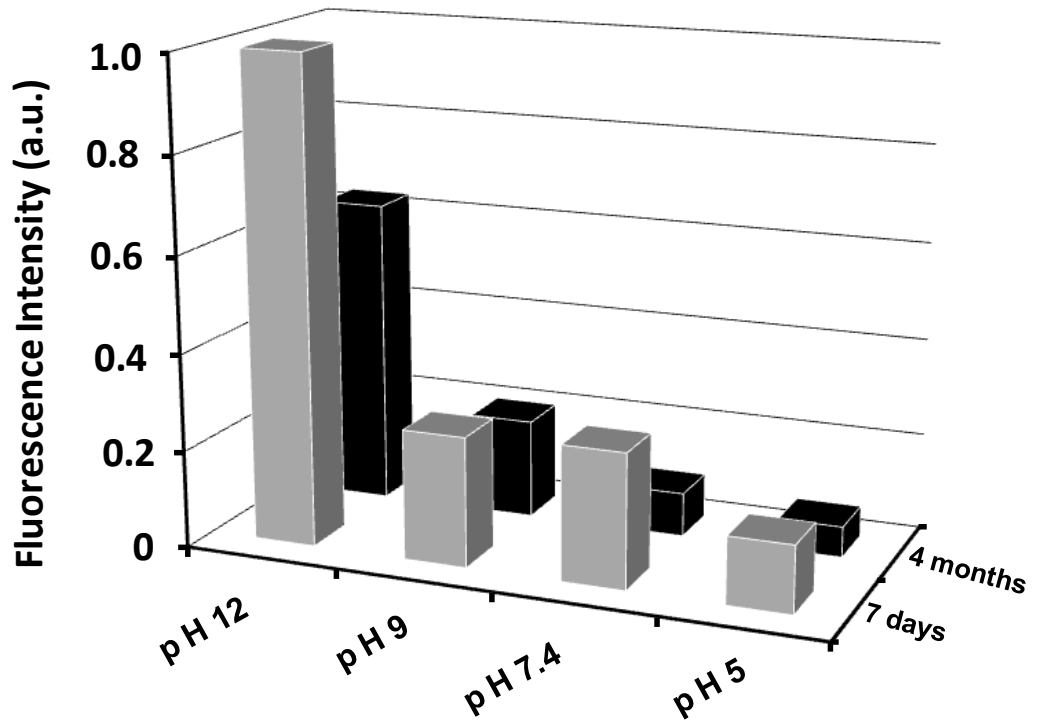
**FIGURE 4**

715

716  
717  
718



719  
720  
721  
722  
723  
724  
725  
726



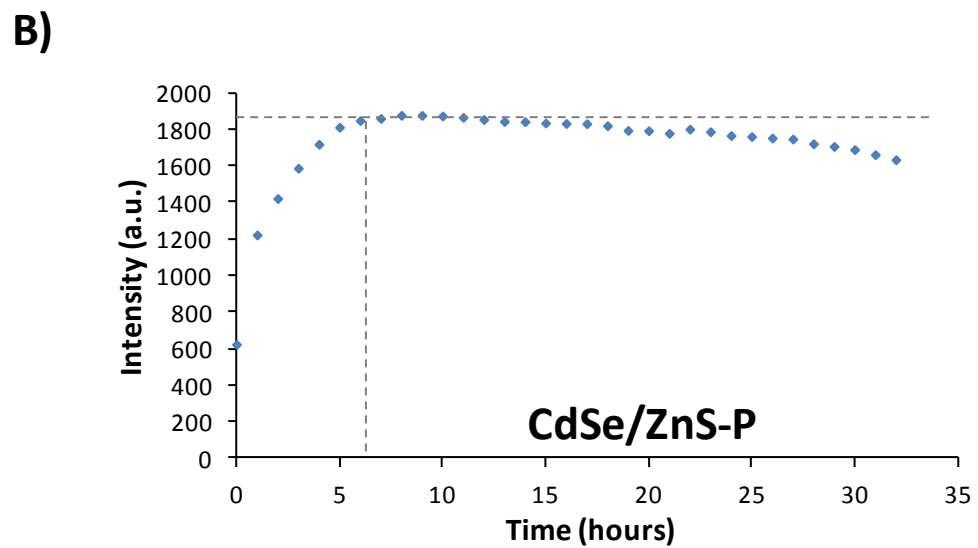
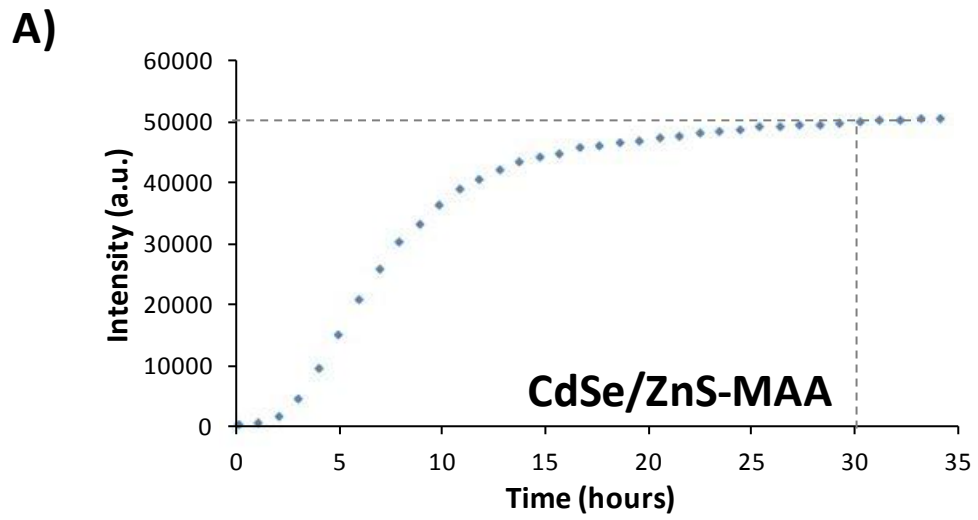
727  
728

729

**FIGURE 5**

730  
731  
732

733  
734  
735



736  
737  
738  
739  
740  
741  
742  
743  
744  
745  
746

747

**FIGURE 6**

748  
749

750  
751  
752  
753  
754  
755  
756  
757  
758  
759

	<b>SAMPLE</b>	<b>QY (%)</b>
(a)	CdSe/ZnS in CHCl <sub>3</sub>	11
(b)	CdSe/ZnS-polymer pH 12	19
(c)	CdSe/ZnS-polymer pH 7.4	3
(d)	CdSe/ZnS-MAA pH 12	6
(e)	CdSe/ZnS-MAA pH 7.4	4
(f)	CdSe/ZnS-MES pH 12	8
(g)	CdSe/ZnS-MES pH 7.4	5

760  
761  
762  
763  
764  
765

**TABLE 1**

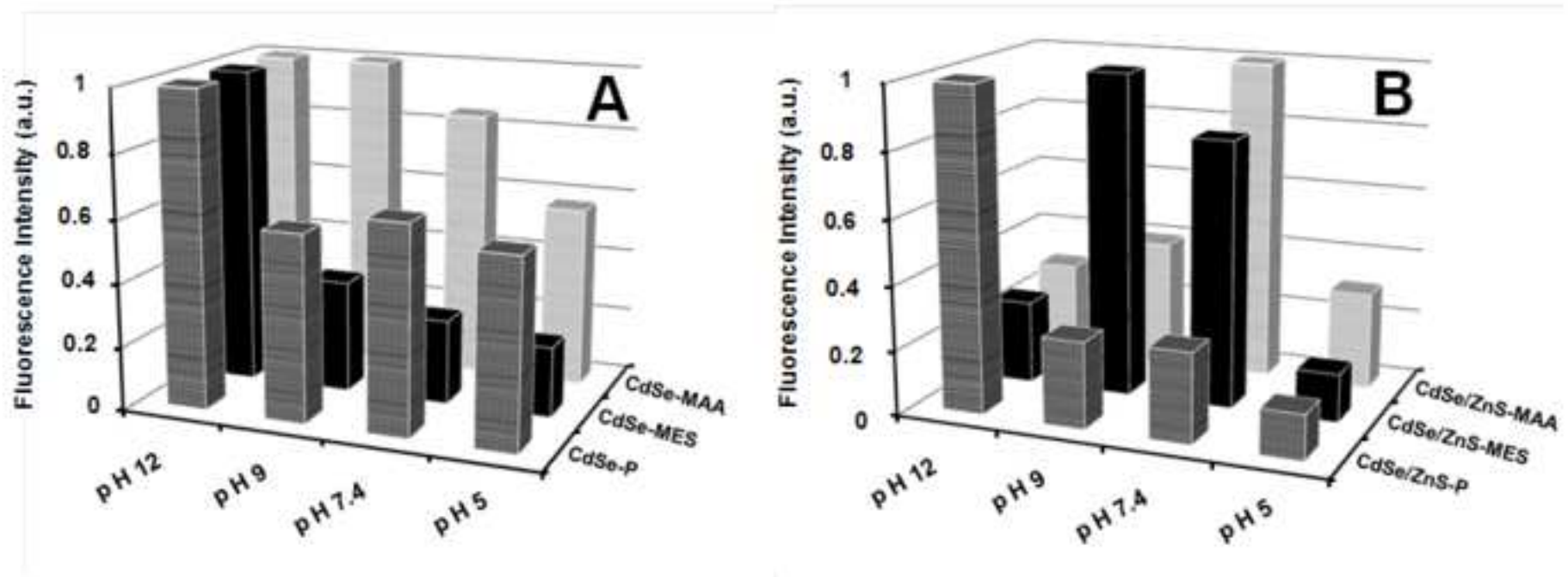


FIGURE 1

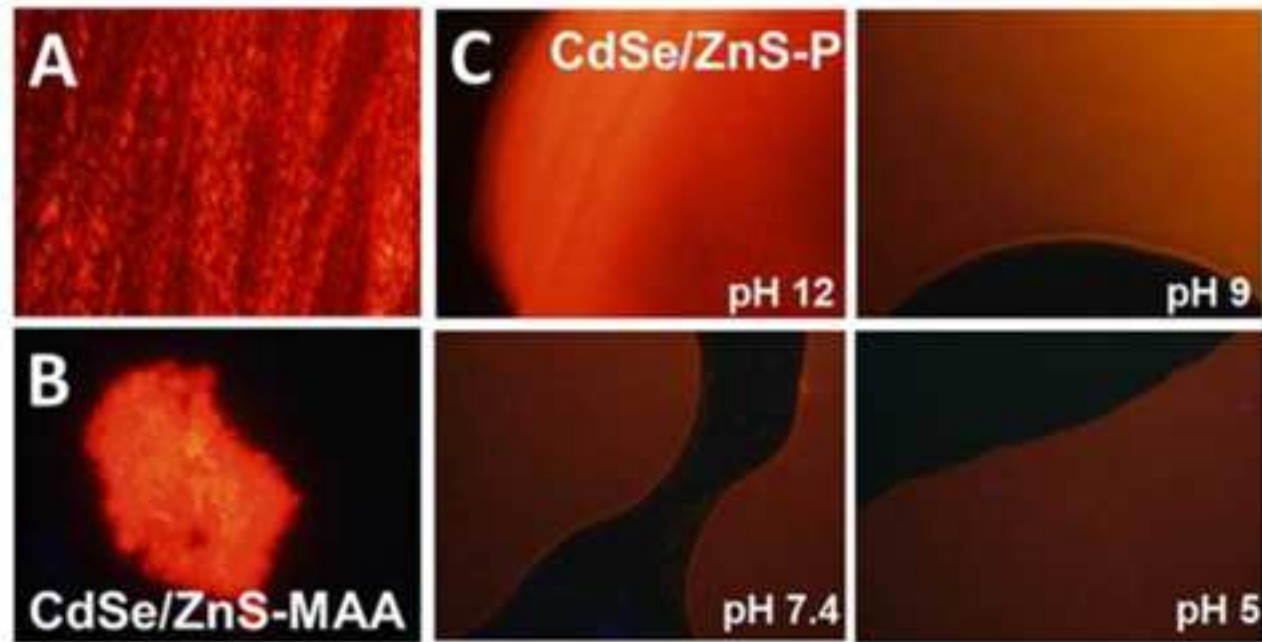


FIGURE 2

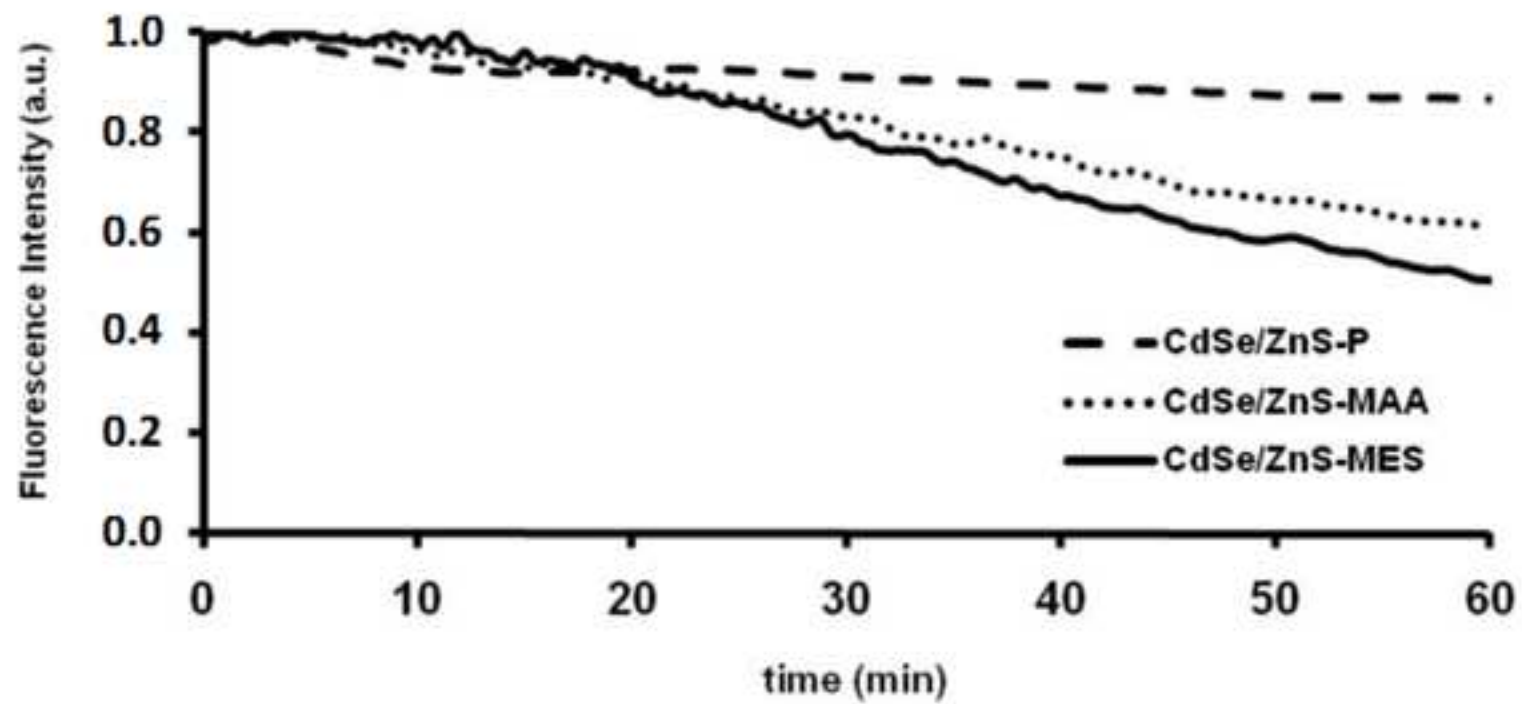
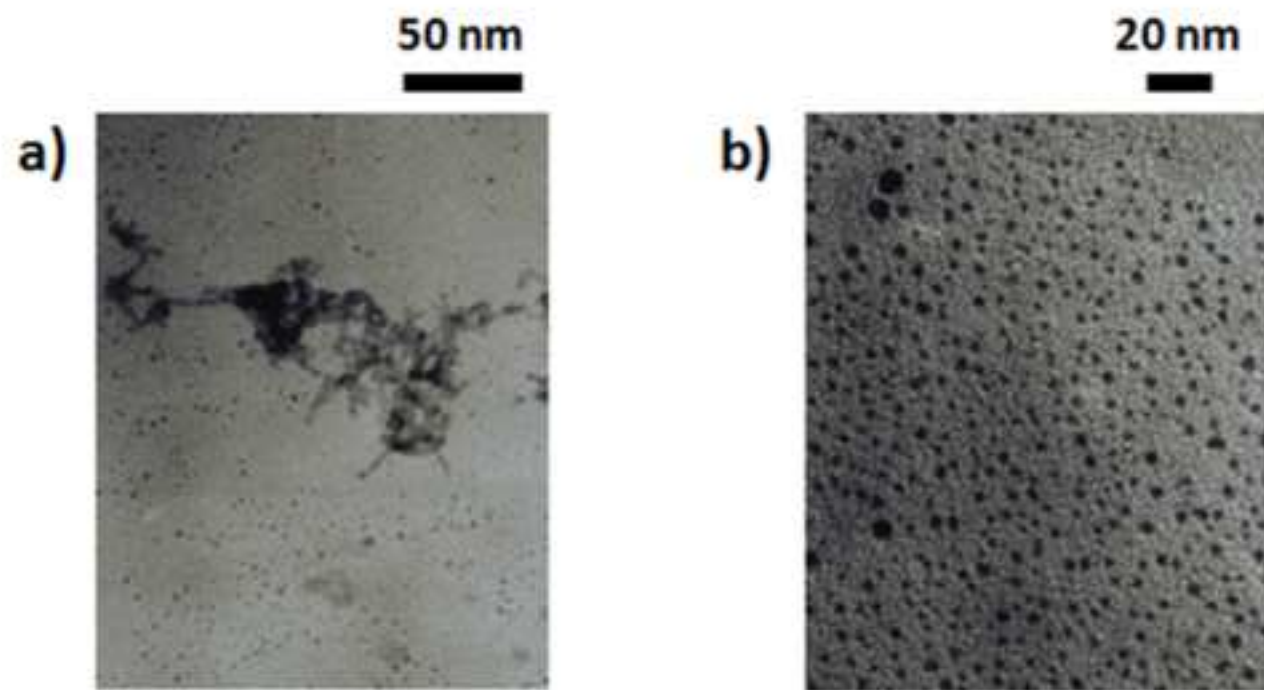


FIGURE 3



**FIGURE 4**

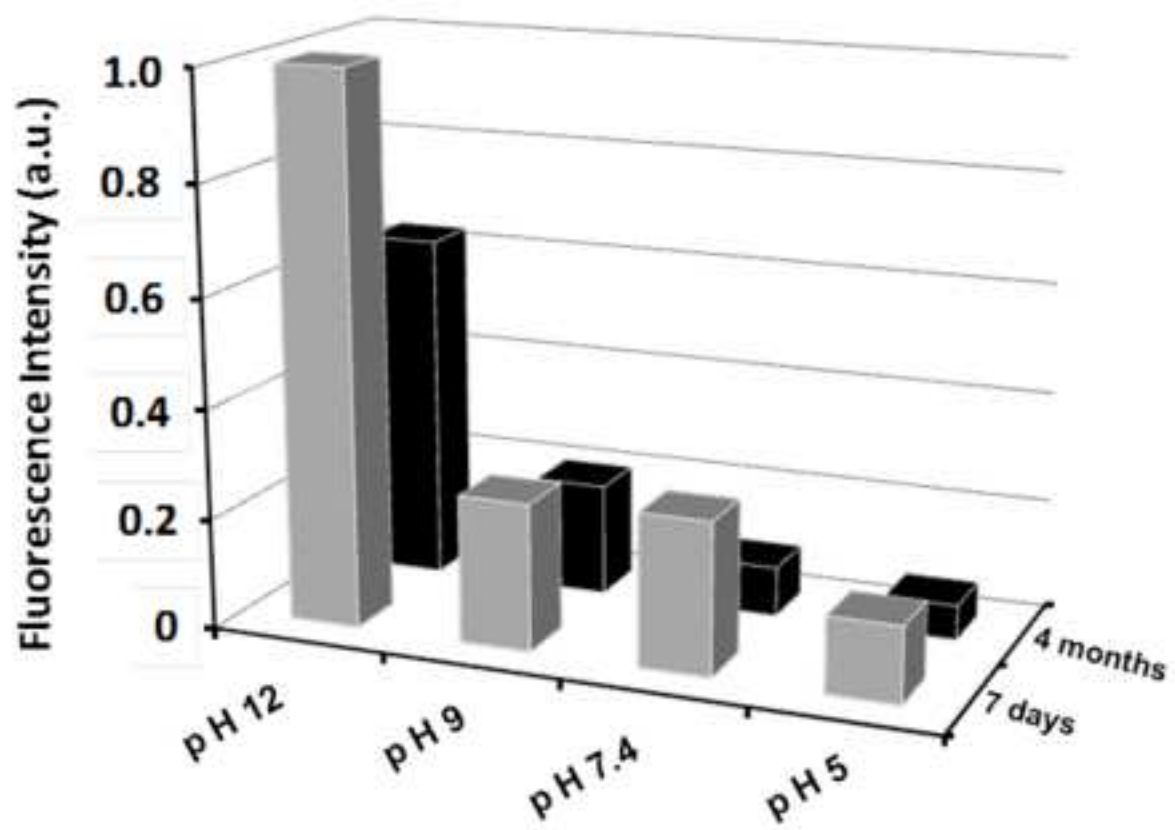


FIGURE 5



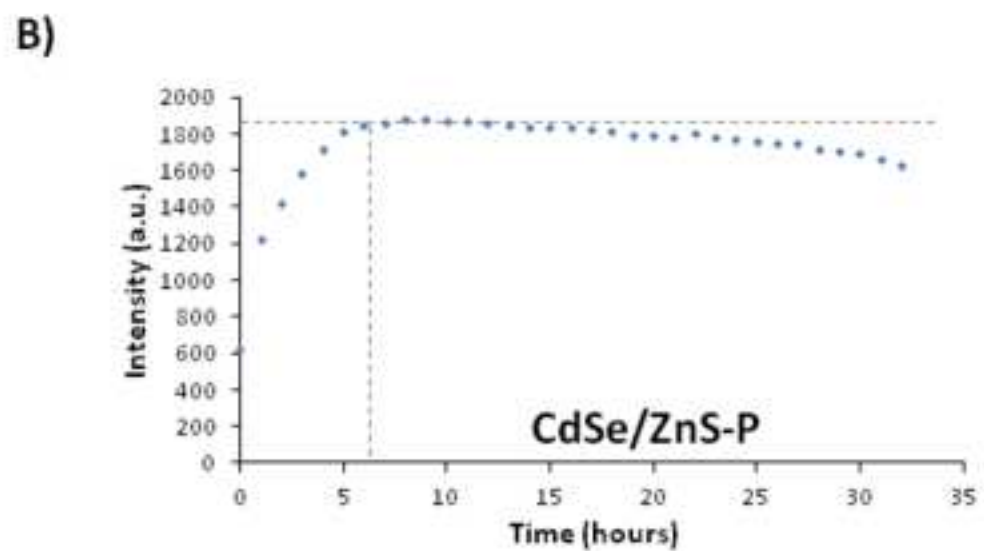
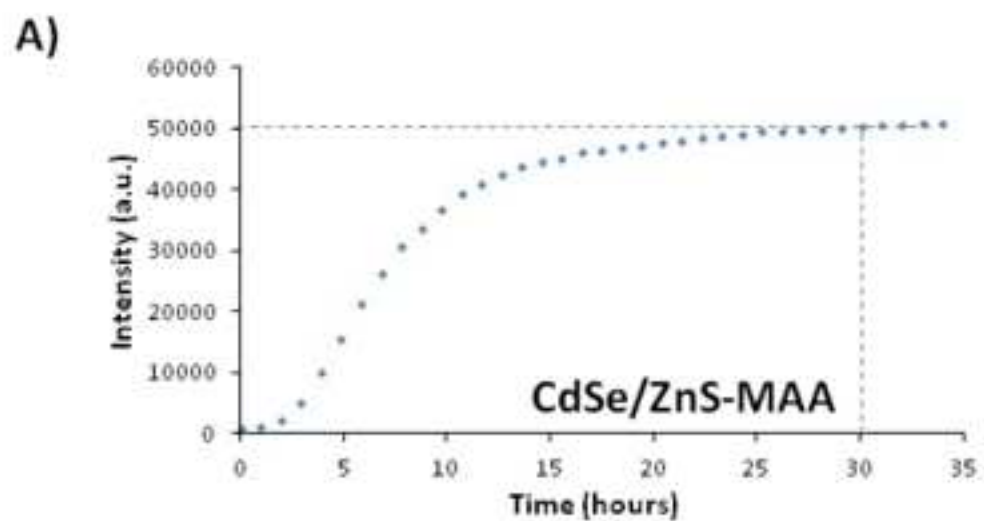


FIGURE 6

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7**TABLE 1**

	<b>SAMPLE</b>	<b>QY (%)</b>
(a)	CdSe/ZnS in CHCl <sub>3</sub>	11
(b)	CdSe/ZnS-polymer pH 12	19
(c)	CdSe/ZnS-polymer pH 7.4	3
(d)	CdSe/ZnS-MAA pH 12	6
(e)	CdSe/ZnS-MAA pH 7.4	4
(f)	CdSe/ZnS-MES pH 12	8
(g)	CdSe/ZnS-MES pH 7.4	5

8  
9  
10  
11  
12  
13



**G.6 NANOPARTICLES AS FLUORESCENT LABELS FOR  
OPTICAL IMAGING AND SENSING IN GENOMICS  
AND PROTEOMICS**

A. M. Coto-García, E. Sotelo-González, M. T. Fernández-Argüelles, J.

M. Costa-Fernández, R. Pereiro, A. Sanz-Medel

Analytical and Bioanalytical Chemistry, 399 (2011) 29-42



# Nanoparticles as fluorescent labels for optical imaging and sensing in genomics and proteomics

Ana María Coto-García · Emma Sotelo-González ·  
María Teresa Fernández-Argüelles · Rosario Pereiro ·  
José M. Costa-Fernández · Alfredo Sanz-Medel

Received: 13 September 2010 / Revised: 7 October 2010 / Accepted: 10 October 2010 / Published online: 30 October 2010  
© Springer-Verlag 2010

**Abstract** Optical labelling reagents (dyes and fluorophores) are an essential component of probe-based biomolecule detection, an approach widely employed in a variety of areas including environmental analysis, disease diagnostics, pharmaceutical screening, and proteomic and genomic studies. Recently, functional nanomaterials, as a new generation of high-value optical labels, have been applied to molecular detection. The great potential of such recent optical labels has paved the way for the development of new biomolecule assays with unprecedented analytical performance characteristics, related to sensitivity, multiplexing capability, sample throughput, cost-effectiveness and ease of use. This review aims to provide an overview of recent advances using different nanoparticles (such as quantum dots, rare earth doped nanoparticles or gold nanoparticles) for analytical genomics and proteomics, with particular emphasis on the outlook for different strategies of using nanoparticles for bioimaging and quantitative bioanalytical applications, as well as possibilities and limitations of nanoparticles in such a growing field.

**Keywords** Proteomics · Nanoparticle · Bioanalysis · Genomics · Imaging

---

Ana María Coto-García and Emma Sotelo-González contributed equally to this work.

---

Published in the special issue *Nanomaterials for Improved Analytical Processes* with Guest Editors Miguel Valcárcel and Bartolomé M. Simonet.

---

A. M. Coto-García · E. Sotelo-González ·  
M. T. Fernández-Argüelles · R. Pereiro · J. M. Costa-Fernández ·  
A. Sanz-Medel (✉)  
Department of Physical and Analytical Chemistry,  
Faculty of Chemistry, University of Oviedo,  
Julian Clavería, 8,  
33006 Oviedo, Spain  
e-mail: asm@uniovi.es

## Introduction

Bioanalysis for proteomics and genomics often requires labelling of biochemical compounds for detection. Mass spectrometry techniques offer a label-free and powerful method of detection and are increasingly used in the field. However, they are expensive and cannot be easily applied to fast screening tests or in vivo studies. Alternatively, most other widely used bioanalytical techniques, including detection of isotopes, enzyme-linked chromophore/fluorophores, chemiluminescence and bioluminescence, are methods that could require appropriate analyte labelling. Among them, fluorescent labels play a key role in today's proteomic and genomic studies.

The actual success of fluorescence spectrometry for protein and gene detection today derives from several well-established advantages, including [1]:

- (a) Fast signal acquisition: each individual fluorescent label can potentially provide 107–108 photons per second for detection.
- (b) Multicolour dyes can be used for multiplexed assays.
- (c) High sensitivity of the detection (today many applications of fluorescence are even focusing on single molecule detection).
- (d) The luminescent signal is localized (unlike using some enzyme-linked amplification schemes).
- (e) The labelling process can be straightforward provided that appropriate functional groups are available on the target analyte.

Of course, there are also some important limitations of fluorescence detection in bioanalytics, most of them arising from the organic fluorescent labelling reagents commonly used. Apart from possible difficulties with the labelling reaction, many of the used fluorophore reagents suffer from

photobleaching problems, pH sensitivity, reduced quantum yields or short excited luminescence lifetimes [1].

The recent emergence of synthesis strategies for mass fabrication of nanosized luminescent agents may lead to some of those limitations being overcome, paving the way for the development of more powerful bioanalytical tools. It appears that nanoparticles (NPs) with a variety of shapes, sizes and compositions (such as fluorescent quantum dots and gold nanoparticles) are poised to fundamentally change the bioanalytical fluorescence measurement landscape. The use of NPs could overcome many of the significant chemical and spectral limitations of classical molecular dye fluorophores. Equally important, methods for preparation and handling of nanoparticle–biomolecule conjugates are proliferating and such bioconjugation-ready NPs are becoming commercially available. Moreover, NPs are now being developed for absorbance and emission in the near-infrared (NIR) region—a development which is expected to allow for real-time and deep tissue imaging via optical routes.

The focus of this review is to highlight advances in the use of nanoparticles for bioanalytical applications, particularly in the field of proteomic and genomic studies. Nanoparticles can be used in a wide variety of bioanalytical formats. We will discuss here NPs as optical labels for optical imaging applications, and also their use in the development of bioassays and biosensors of quantitative nature.

The first part of the review focuses on the use of nanoparticles for optical imaging of proteins and genes. Bioimaging always requires an appropriate contrast agent in the target site. This is nowadays often achieved efficiently by using engineered nanoparticles as contrast agents [2]. First, the use of nanoparticles entails accessing target molecules (e.g. proteins or genes) hidden behind tissue barriers, through conjugation of specific targeting groups on their surface. Moreover, for imaging applications with low sensitivity, the highly valuable optoelectronic properties typical of nanoparticles could provide important signal amplification, resulting in higher detection sensitivities. Some representative imaging applications that have been successfully demonstrated by using different nanomaterials (including semiconductor nanocrystals, gold nanoparticles, up-converting nanocrystals or carbon nanoparticles) will be reviewed here.

On the other hand, over the last decade, research efforts to improve the performance of biochemical sensors and bioassays by incorporating different kinds of nanostructures as labels have gained considerable momentum [3]. Therefore, in the second part of this review we summarize the latest developments in the use of nanoparticles as labels, especially in the development of bioaffinity sensors for the detection of nucleic acids and proteins. Inorganic nano-

particle labels based on noble metals and semiconductor quantum dots, combined into highly selective recognition elements (e.g. antibodies or more recently aptamers) appear to be the most versatile systems for these bioanalytical applications.

For development of such applications different analytical instrumental techniques have been employed. Particularly, UV–Vis absorption spectroscopy and surface plasmon resonance were mainly employed when using gold nanoparticles as labels. However, most of the applications described rely on luminescence spectroscopy. Particularly, as will be described below, different photoluminescent techniques have been widely employed in such developments, including conventional fluorescence spectroscopy (very often fluorescence resonance energy transfer mechanisms are employed), fluorescence correlation spectroscopy (based on the analysis of fluctuations on the fluorescence intensity), time-resolved fluorescence spectroscopy (based on the measurement of fluorescence lifetimes), steady-state fluorescence (based on the measurement of the long-term average fluorescence of a sample when irradiated with UV, visible or NIR light), NIR fluorescence (highly valuable for *in vivo* applications, owing to the low backgrounds from the tissues at such wavelengths) or fluorescence microscopy (mainly used in imaging applications).

### Optical imaging of proteins and genes with nanoparticles

Imaging of biological specimens, both *in vitro* and *in vivo*, has long relied on optical microscopy (e.g. fluorescence imaging) and is currently attracting increasing attention as a powerful bioanalytical tool for proteomic and genomic studies as technological advances provide enhanced capabilities. Biochemical imaging research has leveraged the benefits of significant advances in electronics, information technology and, more recently, nanotechnology. Substantial progress in the ability to fabricate high-quality NPs and the discovery and understanding of their outstanding and size-dependent physical and chemical features have stimulated their use in imaging. Particularly, introduction of multifunctional nanoparticles could overcome some of the limitations of more conventional contrast agents (organic dyes) and could constitute a significant thrust in new developments of bioimaging methodologies [2].

Nanoparticles should fulfil some basic requirements in order to be used as labels in imaging applications. NPs are desired to be highly bright, photostable and exhibit excitation and emission without interference from the biological matrix; in addition, NPs have to be soluble in biological buffers, biocompatible and non-cytotoxic. Of course, bioconjugation of NPs to recognition reagents (e.g.

antibodies) has to be possible and effective for them to then be used advantageously for fluorescent labelling of the bioanalytes [4]. Of course, all these conditions are not met yet and the pursuit of such NPs in research laboratories is still a challenging task.

Imaging reagents can be divided into endogenous and exogenous agents. Endogenous agents typically use an enzyme-mediated process inside the body to generate measurable visible light when a given substrate is degraded. The most commonly employed reporter systems are the fluorescent proteins, such as the green fluorescent protein and the luciferin/luciferase bioluminescent system. A drawback of such photoluminescent proteins is that typically they exhibit relatively low emission wavelengths (in the region of 500 nm) often overlapping with the autofluorescence of many tissues (high backgrounds).

Alternatively, exogenous imaging agents, by far the most familiar contrast agents to today's researchers and scientists, range from simple colorimetric contrast dyes to sensitive fluorescent probes and beyond. Nanoparticle-based exogenous optical contrast agents such as quantum dots (QDs), gold nanoparticles (AuNPs), organically modified dye-doped silica, up-converting phosphors and lanthanide-based contrast agents are recent additions to the list of exogenous contrast agents which combine a number of desired features such as resistance to photobleaching, high quantum yield and absorbance, emission in the NIR window or adequate dispersibility in the biological environment. Thus, main advantages and some selected applications for genomics and proteomics imaging of gold nanoparticles, quantum dots, rare earth doped NPs, up-converting nanocrystals and carbon dots are critically discussed below.

### Gold nanoparticles

Although nanosized metals like gold and silver are not still commonly used in fluorescence methodologies, they can provide colorimetric contrast induced by surface plasmon resonance (SPR), whose magnitude is a function of the size, shape and dielectric constant of the medium. Actually, a large number of rather simple colorimetric methods using gold nanoparticles (AuNPs) have been reported.

In fact, AuNPs are now finding increased applications in bioimaging [5], as changes in their optical properties are exploited for applications in hybridization assays, DNA sequencing [6] or detection of genetic disorders [7], among others. Actually, it is possible to use specific organic moieties to fabricate and design nanoparticle aggregates whose spectra are sensitive to particle rearrangements. Typically, stable gold colloids of around 15-nm size with small particle diameters and no aggregation appear red in colloidal solution, and a change of the solution to blue or

violet will indicate aggregation of AuNPs. Based on such an effect, measurements of changes in the optical properties of AuNPs have been proposed for DNA hybridization detection based on a specific DNA target used as linking molecule to aggregate AuNPs containing complementary probe sequences [8]. This measurement allows detection of genetic disorders as well [7].

AuNPs bioconjugates have been applied to polynucleotide detection, using mercaptoalkyl oligonucleotide-modified AuNPs, by exploiting the change in optical properties resulting from plasmon–plasmon interactions between locally adjacent gold nanoparticles [9]. Gold nanoshells have also been fabricated for NIR resonance, and antibodies against target antigens were conjugated to the nanoshell surfaces [10]. When introduced into samples containing the appropriate antigen, the antibody–antigen linkage caused the gold nanoshells to aggregate, shifting the resonant wavelength further into the IR region.

AuNPs have also been used as luminescent agents for fluorescence imaging of proteins. In 2005, gold nanorods were evaluated as two-photon luminescence (TPL) imaging agents. 3D *in vivo* imaging of single nanorods in mouse ear blood vessels was carried out, observing a TPL around 60 times brighter than that obtained when using the common imaging reagent rhodamine, thereby proving the great potential of these agents for biological imaging [11].

More recently, Ren and co-workers investigated the fluorescent properties of AuNPs for cancer cell imaging [12]. For this purpose, they employed AuNPs with diameters between 16 and 55 nm, which emitted a stable fluorescence emission centred at 610 nm, for imaging of human epithelial cervical cancer cells (HeLa cells). After labelling the HeLa cells with AuNPs, they were illuminated with an intense light source, giving rise to a photobleaching effect of the cellular autofluorescence, but allowing detection of the stable fluorescence emitted by the AuNPs attached to the cell membrane or inside the cells.

In this vein, Chen and co-workers recently reported the use of gold nanocubes with high quantum yield for imaging cell lines of human liver cancer and human embryo kidney [13]. They observed much higher quantum yield with gold nanocubes than with gold nanorods (about 200 times higher). Of course, these high quantum yield NPs are a leap forward in the search for useful fluorescent AuNPs.

In any case, colloidal AuNPs show much weaker fluorescence than that observed with alternative nanoparticles, but they exhibit some added features that make them attractive for bioimaging applications. For instance, they do not suffer from any photodecomposition and largely retain their optical properties (however, their emission may vary depending upon the surrounding medium), they are apparently not toxic (in sharp contrast to other more fluorescent nanoparticles) and they have good



colloidal stability. Moreover, the ability to shift their optical properties, in a controlled fashion, to the spectral region best suited for optical bioimaging applications could open the way to numerous applications in the field [2]. The weakest point, however, is still AuNPs' comparatively low emission quantum yields which should be enhanced [14].

### Quantum dots

Quantum dots (QDs) are nearly spherical, luminescent nanosized crystals made of semiconductor materials of the order of 2- to 10-nm diameter, with size-dependent optical properties [15]. A decrease in the crystal size causes an increase in energy shift between the absorbing and the emitting state. High quantum yields, narrow size-tunable emission and high resistance to photobleaching or to chemical degradation so far make QDs the preferred fluorescent probes for imaging applications. These nanocrystals have unparalleled sensitivity and spatial resolution, as compared to the organic fluorophores currently used [15]. Also, QDs with an organic capping perform even better. Such QDs typically have a nanocrystal core with an inorganic capping and an outer organic group to help further conjugations or functionalization. For instance, a ZnS-capped CdS QD is 20 times brighter than rhodamine and at the same time 100 times more stable to photobleaching [16]. Moreover, QDs of different sizes can be excited at a single wavelength and emit at multiple wavelengths, allowing their application in multiplexed assays [17].

Owing to all these exceptional optoelectronic characteristics, the use of QDs as luminescence probes in bioimaging has increased significantly since the first examples from Alivisatos [15] and Nie's [16] groups. The strategies proposed in such pioneering developments solved the problem of water-solubilization and biocompatibility of QDs, opening new avenues for their application in bioimaging. During recent years QDs have been used as fluorescent imaging labels for the study of live cell single-molecule dynamics, monitoring of intracellular protein-protein interactions, disease detection in deeper tissues, detection of tumour cells based on selective binding of bioconjugated QDs to known cancer biomarkers, and much more [18]. Fluorescent QDs have been widely applied to *in vitro* cellular imaging, biomolecular tracking in cells and tissue staining [19]. As an example, QDs linked to IgG and streptavidin were used to label different types of targets (breast cancer marker Her2, actin, microtubule fibres or nuclear antigens) at different locations (surface, intracellular or inside the nucleus) [20]. Recent fluorescent imaging research makes use of different types of biomolecules, such as peptides, antibodies or aptamers conjugated to the QDs, allowing the selective detection of different tumour bio-

markers, actin filaments, specific cells, etc. Many examples are reviewed in recent articles [19]. Quantum dots were also demonstrated to be very important for optical imaging in the NIR spectral region and, actually, some important bioanalytical applications have been developed [21]. The practical application of QDs in biomedical imaging can be widened by the synthesis of novel NIR QDs [21].

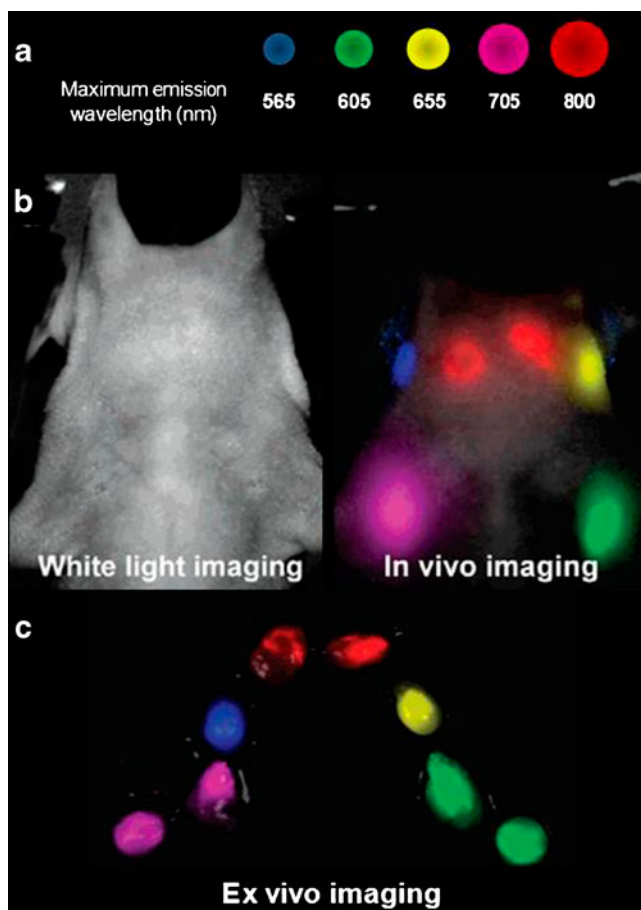
In parallel, great effort has been made to obtain a facile method for robust and efficient cellular delivery of QDs for *in vivo* imaging. In particular, many studies have focused on achieving appropriate delivery of the nanoparticles to the cytosol of cells (this has been found to be more complex than extracellular targeting) as different factors could affect the uptake of the QDs into cells. Different intracellular labelling approaches have been evaluated, including passive uptake, receptor-mediated and non-specific endocytosis, liposome-mediated intracellular delivery, electroporation or micro-injection [22]. However, as QD material or surface ligand chemistry was found to be determinant for the final uptake of the nanoparticles, more work needs to be done in this direction in order to avoid QD aggregation or deposition in endosomes or lysosomes [23].

Nowadays, QDs are widely employed for *in vivo* imaging of the vascular networks of mammals such as lymphatic and cardiovascular systems (see Fig. 1) [24]. Owing to their suitable particle size, and the NIR bright emission, QDs possess some important advantages, such as fast movement through the lymphatic network allowing a highly sensitive real-time observation [25].

It is worth mentioning that QDs have a promising future in cancer diagnosis and therapy [26]. Cancer cells possess surface receptors that can be employed as targets which can be recognized by specific antibodies, peptides or proteins conjugated to QDs. Examples of those receptors are Her2 (human epidermal growth factor receptor 2), ER (estrogen receptor), EGFR (epithelial growth factor receptor) and mTOR (mammalian target of rapamycin). In this sense, the first *in vivo* application of QDs for cancer imaging was carried out in 2002 by Åkerman and co-workers by conjugating QDs to three different peptides with affinity for tumour cells, which allowed their guidance to tumour vasculatures in mice [27].

Research in this field continues to grow [28] and more recent applications of QDs to *in vivo* fluorescent imaging of proteins for cancer diagnosis include early detection of primary tumours such as prostate [29], pancreatic [30] or liver cancer [31].

Considering that QDs of different sizes can be excited at a single wavelength but emit luminescence at multiple wavelengths, such nanoparticles are specially suited for multiplexed imaging. To this end, Nie and co-workers very recently performed a multiplexed immunohistological



**Fig. 1** **a** Schematic representation of different carboxyl QDs employed in fluorescence imaging of a mouse. **b** Five QDs were injected intracutaneously in primary draining lymph nodes and were simultaneously visualized as different colours through the skin in the in vivo image. **c** Ex vivo fluorescence image of lymph nodes after surgical resection. (Reprinted with permission from REFERENCE [24]. Copyright 2007 American Chemical Society)

staining in order to carry out a molecular mapping of tumour heterogeneity on human prostate cancer [32]. For this purpose, four protein biomarkers (E-cadherin, high molecular weight cytokeratin, p63, and  $\alpha$ -methylacyl CoA racemase) were conjugated to four QDs of different emission wavelengths, thus targeting diverse tumour areas with different colours when they were excited simultaneously. Tumour heterogeneity was observed at the molecular, cellular and architectural levels, allowing direct visualization of their structural transitions—an achievement not possible with traditional organic dyes.

Within a few years QDs have gained recognition as very versatile nanomaterials for fluorescence imaging in vitro and in vivo, and particularly for multiplexing studies. They are available in a large variety of surface chemistries and there are today many conjugation strategies for derivatization with virtually any biologically active molecule. QDs will be the probe of choice for long-term, high sensitivity

and multicontrast imaging of molecular dynamics in biological samples. However, there are still a number of issues pending that warrant attention before QDs' full potential in this field can be realized. After nanoparticle surface coating (to improve its dispersion in water and bioconjugation) the observed dimensions of a QD are close to those of large proteins (10–25 nm) and this may limit access of the fluorescent labels to the biomolecules in cells for in vivo imaging. Another negative photophysical aspect of these nanoparticles which limits their use in bioimaging applications, is the phenomena of fluorescence intermittency (blinking), typically affecting QDs [33]. Moreover, nowadays there is a great controversy about the toxicity linked to such particles. In fact, the widespread replacement of organic fluorophores with QDs in bioimaging is hindered by the inherent chemical cytotoxicity expected from the individual ions (such as  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Se}^{2+}$  and  $\text{Te}^{2+}$ ) that the QDs are composed of. Novel materials are being investigated for QDs preparation with the aim of avoiding many of these limitations, and much more work should be carried out in this direction.

#### Rare earth doped particles and carbon dots

Conventional fluorescence imaging is based on single-photon excitation, in which a high energy source is employed. However, the possibility exists of taking advantage of alternative “up-conversion fluorescence” imaging mode. This is based on the conversion of two or more low energy excitation photons (from the infrared spectral region) to higher energy emission photons (in the Vis spectral region), also known as anti-Stokes emission. In this mode, some weaknesses found in conventional fluorescence imaging (like tissue autofluorescence, short tissue penetration depth, DNA damage or cell death upon long-term exposures to high energy radiation) are minimized as infrared excitation is employed [34].

Again, present nanotechnology advances are playing a critical role in the progress of up-conversion fluorescence imaging. Recent advances in the synthesis of up-converting nanocrystals (UCNs) could be used in the development of higher sensitivity imaging techniques for biochemical applications. Nanosized up-converting particles typically consist of a  $\text{LaF}_3$ ,  $\text{YF}_3$ ,  $\text{Y}_2\text{O}_3$ ,  $\text{LaPO}_4$  or  $\text{NaYF}_4$  host lattice which is doped with trivalent rare earth ions, such as  $\text{Yb}^{3+}$ ,  $\text{Er}^{3+}$  and  $\text{Tm}^{3+}$  [35]. These nanocrystals are excited in the IR or NIR region and emit in the Vis–NIR. Importantly, because the autofluorescence is minimal in such spectral regions, the observed background signal is much lower with such materials. Moreover, up-converting nanomaterials show excellent photostability, low toxicity and the emission wavelength can be altered by changing the doping metals within UCNs. These

properties make them a promising non-toxic alternative for clinical imaging applications [36].

UCNs have been recently evaluated for optical imaging of blood vessels [37] or lymphatic nodes in mice [36] and they have been used as carriers of porphyrin for photodynamic therapy [38]. One of the most relevant applications described so far was developed by Chatterjee and co-workers [34] who demonstrated the great potential of UCNs, when compared to green-emitting QDs, for imaging of deep tissues in rats, which might be a prelude to the use of UCNs in bigger animals [34]. Another recent example is the use NaYF<sub>4</sub>-type UCNs modified with carboxylic groups and conjugated to streptavidin in the development of a fluorescence (or Förster) resonance energy transfer (FRET)-based nanoprobe for DNA imaging by attachment of a biotinylated oligonucleotide [39].

Another promising type of new-generation nanoparticles for optical imaging are carbon dots. As mentioned before, the high content of toxic metals in typical semiconductor QDs has prompted health and environmental concerns. This might represent a serious limitation for their *in vivo*, and even *in vitro*, applications. Thus, research on the use of alternative low-toxicity nanomaterials is an important and urgent requirement [40].

For this purpose, nanosized pure carbon particles, known as carbon dots (C-dots), constitute one of the new-generation nanomaterials showing a bright and colourful photoluminescence when their surface is passivated with organic molecules via covalent linkage or chemical adsorption, such as polyethylene glycol (PEG) derivatives or poly(propionylethyleneimine-*co*-ethyleneimine (PPEI-EI) [41]. Even though these nanoparticles exhibit luminescence with lower quantum yields than those of QDs, advantages in terms of biocompatibility and toxicity have been reported in cell lines and mice, and their applicability for both *in vitro* and *in vivo* imaging applications has been already demonstrated [42, 43].

C-dots have also been used for *in vivo* biosensing applications based on NIR fluorescence. Excitation of the nanoparticles with a pulsed laser in the NIR (800 nm) afforded low backgrounds and minimized the light scattering. For example, two-photon luminescence microscopy has been successfully used for imaging of human breast cancer cells with internalized carbon dots [43].

Further improved emissions and applications of this new type of novel nanoparticles for biochemical imaging are expected in the near future. However, we have to take into account that synthesis protocols and characterization tools of carbon dots are not well established yet (they are a new type of emerging and novel nanomaterials). Therefore, they have several shortcomings, mainly related to the low reproducibility. For instance, some studies showed a limited homogeneity of the C-dots in terms of fluorescence

brightness at the individual dot level [43]. Further improvements in the synthesis and characterization procedures of such nanoparticles are still required.

### Nanoparticles as quantitation labels in biochemical sensors and assays

In the past few years, nanoparticles have also actively entered the field of analytical biosensors, by using them as transducers of hybridization phenomena. In fact, the exciting properties of NPs have been exploited to develop new biosensing and bioassay approaches; here we will highlight their use in the proteomics and genomics fields.

Although the use of NPs for bioimaging does not necessarily imply quantitative analytical measurements (i. e. DNA or protein determinations), biosensing requires quantitative approaches. For such quantitative biochemical applications, nanoparticles are conjugated with biospecific recognition molecules such as antibodies, DNA probe molecules, biotin and streptavidin, or enzymes. Upon binding with biotarget molecules, the binding event can be detected via individual nanoparticles or nanoparticle clusters by monitoring changes in some of the unique optical properties of the nanoparticles.

Thus, this section of the review illustrates a selection of developed strategies and applications of nanoparticles in the quantitative bioanalytical field, with relevance to sensors and assays.

#### Nanoparticle-mediated fluorescence resonance energy transfer

Fluorescence (or Förster) resonance energy transfer (FRET) is a spectroscopic process by which a donor molecule nonradiatively transfers energy over a long distance (1–10 nm) to an acceptor molecule. Because the efficiency of this process is highly sensitive to the distance between the donor–acceptor pair, FRET is an effective tool for investigating a variety of biological phenomena involving changes in molecular proximity or conformation. FRET has been used in a wide variety of applications, ranging from measuring static and dynamic conformational changes in proteins to biosensing or to binding studies.

Several factors complicate the analysis of FRET signals, including photobleaching, spectral crosstalk and direct acceptor excitation; however, these complications could be overcome by exploiting the aforementioned optical properties of nanoparticles. In fact, many of the bioanalysis methodologies reported so far are based on the use of nanoparticles involved in FRET mechanisms to provide versatile biosensing platforms to probe a variety of biological processes. Many FRET-based bioassays for

protein quantification have been already developed based on the use of gold nanoparticles and quantum dots.

### *Gold nanoparticles*

The high molar extinction coefficient of gold nanoparticles (AuNPs) makes them excellent fluorescent acceptor materials for the development of FRET-based biosensors [44]. As an example, AuNPs were employed as acceptor species in the development of a biosensor for thrombin [45] and several biosensing strategies were evaluated. In a first approach, a thrombin aptamer was immobilized on the surface of the AuNPs and a complementary dye-labelled single-strand DNA (ssDNA) was then hybridized with the AuNP-aptamer so the fluorescence of the dye (donor) was quenched by gold nanoparticles. After thrombin addition, the binding between thrombin and aptamer causes dissociation from ssDNA and, thus, the dye fluorescence subsequently recovered. In a second approach, a dye-labelled thrombin aptamer was hybridized with AuNP modified with ssDNA. The binding of thrombin released the labelled thrombin aptamer and the fluorescence from the dye was detected. The second approach involves more laborious procedures, but results were more homogeneous and the recognition exhibited better detection limit than the first approach. Finally, a dye-labelled thrombin aptamer was adsorbed on AuNPs and, consequently, its fluorescence was quenched. With the addition of thrombin, the binding between thrombin and aptamer induced a conformational change in the aptamer causing the release of the aptamer and subsequent fluorescence recovery. This latter approach was more simple, fast and convenient, but results were highly inhomogeneous and the detection limit was worse than in the previous strategies [45].

Alternatively, gold nanoparticles were also employed as fluorescent donors in the development of a FRET-based bioassay. In this approach, AuNP bioconjugated with a platelet-derived growth factor (PDGF) aptamer (Apt-AuNP) acts as a quencher, while fluorescent gold nanodots (AuNDs) modified with PDGF emit photoluminescence. As a result of the high affinity between aptamer and target, when AuND-PDGF and AuNP-aptamer are in the same solution the photoluminescence of AuNDs decreases due to a quenching process occurring between Apt-AuNP and PDGF-AuNDs. This method was applied to the detection of PDGF in urine samples from healthy persons [46].

### *Quantum dots*

One of the most frequently employed strategies involving QDs as fluorescent labels is their use as energy donor molecules in FRET [47]. QDs exhibit several properties that can benefit their use as donors: their large surface area

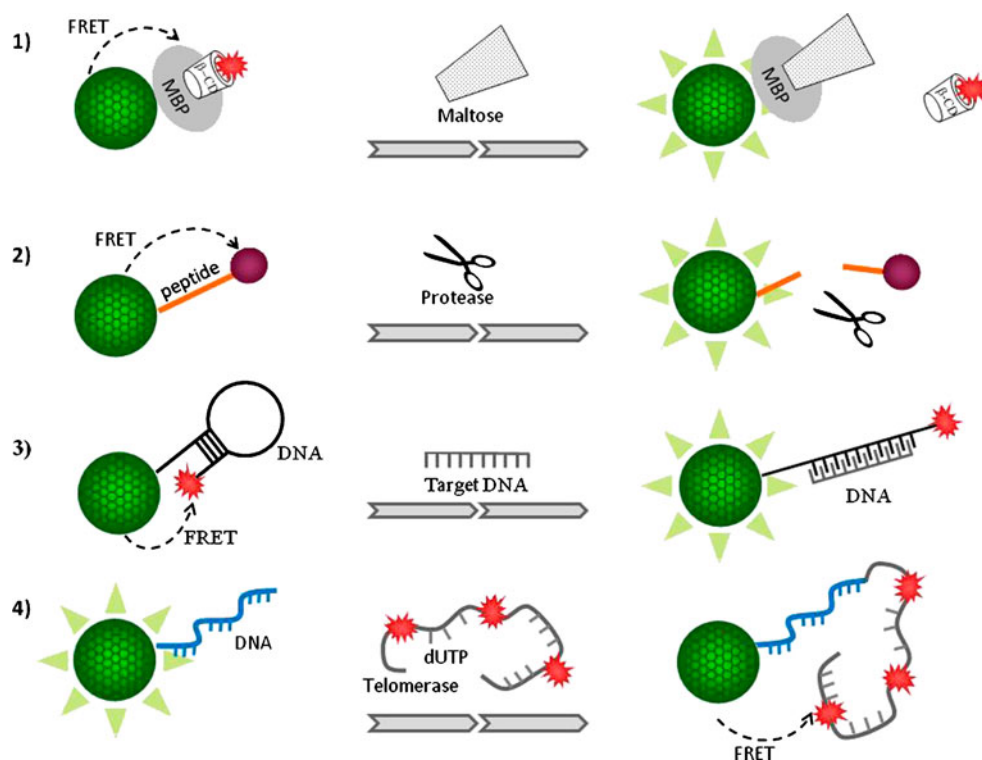
enables the binding of several proximal acceptors (proteins, peptides or oligonucleotides) to one NP, providing a highly efficient spectral overlap. Another key feature is the possibility to control their emission by changing the core size, which facilitates the spectral overlap between donor and acceptor. Therefore, theoretically we will always be capable of selecting an adequate QD that matches the acceptor dye, just by controlling the QDs size and material. The QDs' large Stokes shift and their wide absorption spectra also reduce direct excitation of the acceptor. Hence, all these advantageous properties offer the possibility to achieve "multiplex" energy transfer configurations, making use of just one excitation source.

In fact, QDs have been used in different FRET-based assays for protein and gene detection. For this purpose, a FRET-based bioassay was developed by using QDs functionalized with appropriate proteins to recognize and bind a similar target. In this assay, the bioconjugate captures the dye-labelled analogue, leading to loss of emission fluorescence when the FRET process takes place. The presence of the target molecule competes for its labelled analogue, and binds to the receptor protein. Thus, the acceptor is displaced from the QD surface, giving rise to a progressive enhancement of the fluorescent signal. Making use of this methodology, one can obtain information about the kinetics or the dissociation constant. This scheme was first employed by Mauro and co-workers for the development of a maltose biosensor [48]. Maltose binding protein (MBP) was attached to the QD surface via metallic affinity interaction. The QDs were previously modified with beta-cyclodextrin ( $\beta$ -CD) and the quencher QSY9, providing an efficient fluorescent quenching. The addition of maltose competes for binding sites in MBP, displacing the  $\beta$ -CD-QSY9, and an increase in fluorescence intensity was recorded. Figure 2 summarises different approaches to the use of QDs in FRET bioassays.

Very recently, a novel platform for effective sensing of biomolecules was designed by measuring the FRET efficiency from QDs modified with a molecular beacon (MB) to graphene oxide (GO). After GO was added to the QD-MB bioconjugate a strong quenching effect was detected due to an energy transfer from the QD to the GO. In the presence of the target DNA a change in the FRET efficiency occurs, providing the basis of the biomolecule (e.g. thrombin) biosensing [49].

QDs, as donor agents, have been employed to develop FRET-based biosensors to determine many other proteins such as thrombin, caspase, collagenase and chymotrypsin [50]. Moreover, through immobilization of different fluorescent acceptors on different sized QDs, multiplexed detection of biological enzymes, such as protease, polymerase and nuclease, can be achieved [51].

**Fig. 2** FRET strategies for analyte-mediated distance changes. 1 Analyte displaces fluorescent ligand. 2 Analyte cleaves donor–acceptor linkage. 3 Analyte changes the conformation of acceptor–donor linkage. 4 Analyte mediates donor–acceptor binding. (Reprinted from REFERENCE [86] with permission)



The use of QDs as energy acceptors in FRET-based methodologies is not so common. In those approaches, the donor used has to emit luminescence at a wavelength shorter than that of the QD (to allow the FRET process to occur). As a most recent example Geissler et al. developed a time-resolved fluoroimmunoassay format based on a FRET process from visible-emitting lanthanide complexes of europium and terbium streptavidin labelled (as energy donors) to semiconductor CdSe/ZnS biotin coated nanocrystals (as energy acceptors). This strategy allowed the determination of five biomarkers in a highly sensitive multiplexed assay [52].

QD-FRET has also been incorporated into nanosensors for genetic analysis. Zhang et al. developed a DNA nanosensor comprising a QD and a pair of sequence-specific probes for detection of nucleic acid targets. A biotinylated capture probe and a Cy5-labelled reporter probe cohybridize to target DNA to form a sandwich structure that can be captured by a streptavidin-conjugated QD. The QD functions both as a FRET donor and as a scaffold that increases local target concentration for signal amplification. This QD-FRET nanosensor has an extremely low level of fluorescence background and produces a very distinct FRET signal upon binding to even a small amount of DNA targets [53].

#### Immunoreaction-based nanoparticle assays

Immunoassays, based on the highly selective interaction and binding of antibodies to antigens, can be monitored by

measuring the analytical signal provided by a label, attached either to the antigen or to the antibody. Although new techniques for direct and specific monitoring of such antibody and antigen interaction have become available in recent years (e.g. surface plasmon resonance and related techniques), the most common quantitative assays rely on indirect approaches based on chemical labelling strategies [54].

Different types of nanoparticles have attracted increasing interest for bioanalytical labelling applications in recent years. Actually, nanoparticles with anchor groups for linkage to biomolecules are today commercially available, enabling simple linkage to peptides/proteins via functional groups (e.g.  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{NH}_2$ ) attached to the surface of the nanoparticles. The driving force behind the use of nanoparticles as tags in biological assays is to eliminate the need for either organic fluorophores or radioactive labelling, both of which have shortcomings. In fact, many labelling experiments already described using nanoparticles would not have been possible with organic dyes (e.g. multicolour labelling with a minimal set of filters, long-term monitoring of dynamic processes).

Semiconductor quantum dots are often used in the development of improved immunoassays and immunosensors. QDs have been employed as luminescent labels in the development of a high number of immunoassays to study biorecognition events and for quantification of different biochemical species such as proteins or nucleic acids [4]. In this vein, a recent assay evaluated the use of nanohybrids to

build agglomerates in the presence of a specific antigen, which were more than one order of magnitude larger than their individual components. The final agglomerate size depends on several factors such as relative concentrations of conjugates and antigen molecules, and it can be characterized by flow cytometry. This methodology allowed the detection of agiopoietin-2 and mouse IgG at the sub-picomolar level. The main advantage of this approach is that it enables simultaneous detection of multiple antigenic biomarkers in physiological media, which can be especially useful in early detection (alarm sensors) or screening of tumours and other diseases [55].

As many biotinylated antibodies are now commercially available, one of the most employed strategies to attach the NPs to biomolecules is the avidin–biotin interaction. This approach was employed by Goldman et al. in the first QD-based simultaneous multianalyte assay, in which avidin–QDs were used as fluorescent labels [56]. After this first attempt, other similar immunoassays for the detection of foodborne pathogenic bacteria, *Escherichia coli* and *Salmonella*, were developed. QDs with different emission wavelengths were conjugated to anti-*E. coli* and anti-*Salmonella* antibodies. Target bacteria were separated from the sample by using magnetic beads coated with specific antibodies. These beads then reacted with QD–antibody conjugates to form bead–QD complexes, and fluorescent emission from the QDs was used for the determination of *E. coli* and *Salmonella* cells [57].

Several limitations of QDs have been described which hinder their applicability in the development of immunoassays, particularly limitations due to the big size of the QD–antibody bioconjugates and the lack of specific sites in the antibodies after binding the QD [58].

Alternatively, for colorimetric immunosensing assays, the use of gold nanoparticles as labels is exceptionally attractive. When using AuNPs as labels, the basis of the immunoreactions detection is the colour change due to the interparticle plasmon coupling during AuNPs aggregation (red to purple/blue) or during redispersion of AuNP aggregates (purple to red). In addition to the advantageous properties of such nanoparticles already described, the high extinction coefficient of AuNPs allows the development of highly sensitive immunosensors. In fact, different examples of the application of AuNPs in immunosensing assays for proteomic studies have been described.

Peptide-stabilized AuNPs have been enzymatically biotinylated by a kinase-catalysed reaction using biotin–ATP as a co-substrate. Upon mixing with avidin-modified particles, solutions of biotinylated particles change colour from red to blue, indicating aggregation of the nanoparticles. On the basis of this reaction, Wang et al. developed a simple colorimetric test to monitor kinase inhibitor activity [59]. A similar approach, based on

peptide-induced aggregation of AuNPs, was developed to sense phosphatase activity. Once the phosphate group is eliminated by alkaline phosphatase, peptide-induced AuNP aggregation is triggered, resulting in a significant change in absorbance at 650 nm [60]. This format assay allows simple, quick and inexpensive monitorization of the dephosphorylation reaction, which is a challenging task because the loss or gain of nucleotide phosphate group cannot be easily distinguished by conventional spectroscopic methods [61].

Surface derivatization of AuNPs with antibodies or proteins has also been used to determine proteins or protein–protein interactions in biological samples. In this way, Pittner and co-workers developed an optical immuno-chip biosensor for allergen detection (ovalbumin and ovomucoid) in complex matrices using AuNPs as signal transducers [62]. Based on this approach, a simple and rapid colorimetric solid-phase immunoassay has been reported, in direct and sandwich formats, with a readout system that does not require complex instrumentation.

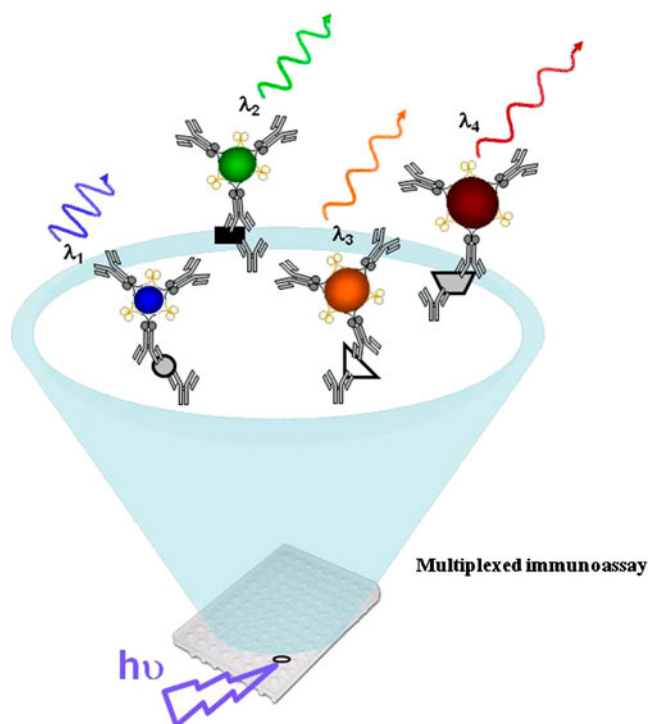
The increasing number of applications of nanoparticles in immunoassays shows their growing importance and analytical potential. The amplification effect on the signal, reduced photobleaching effects, safe handling in comparison with radioisotopes, use of one less reaction step compared with ELISAs, and the possibility of performing multiplexing assays are great advantages which warrant the increased use of NPs-based bioassays in the future.

### Multiplexed assays

Nanoparticles hold particular promise as the next generation barcodes for multiplexing experiments (see Fig. 3). Genomic and proteomic research demands greater information from single experiments. Conventional experiments utilize multiple organic dyes to barcode different analytes in a single experiment, but positive identification may be difficult due to spectral crosstalk among the different dyes.

Taking advantage of the narrow emission and broad excitation spectra of QDs, several assays have been developed to detect various analytes simultaneously. In this sense, several methodologies are based on the use of specific antibodies bioconjugated with QDs. In an early typical development, Goldman and co-workers bioconjugated four types of luminescent QDs with four different specific antibodies to perform a multiplexed fluoroimmunoassay for the simultaneous detection of cholera toxin, ricin, shiga-like toxin 1 and staphylococcal enterotoxin B in single wells of a microtiter plate [56].

In a further development, Algar and Krull demonstrated the potential of aptamer–QD assemblies to develop a simultaneous two-colour diagnostic scheme based on FRET. For this purpose, two different colour QDs were



**Fig. 3** Scheme of multianalyte immunoassay. Four analytes can be detected simultaneously in a sandwich assay format from a single well of a microtiter plate. Antibodies against all four analytes are adsorbed on the wells of plates, exposed to a mix of all four analytes, and analytes detected by anti-toxin antibodies conjugated to the various QDs. (Reprinted from REFERENCE [87] with permission)

conjugated with oligonucleotide probes acting as donors, and after hybridization with the two target sequences of oligonucleotides, labelled with organic fluorophores as acceptors for each QD, the FRET process takes place allowing the simultaneous detection of two nucleic acids [63].

In a third interesting example, QDs of different sizes were coated onto magnetic microbeads generating nanobarcode beads (Qbeads). The spectrum of the resulting microparticles provided an optical code for the specific composition of the particles. The further conjugation of gene-specific oligonucleotide probes to the surface of each nanobarcode bead allows the creation of a multiplexed gene expression analysis [64].

#### Nanoparticles in aptamer-based detection of genes and proteins

Aptamers are short single-strand DNAs/RNAs with high affinity and specificity towards a great variety of molecules, from ions to whole cells and even intact viral particles. They are selected from combinatorial libraries of oligonucleotides with different sequences, via an *in vitro* iterative process of adsorption, recovery and reamplification known

as systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX) [65]. Aptamers offer several advantages to being used in biosensing including cost-effective synthesis, high binding affinities for their targets and flexibility for signal transduction and detection. Moreover, in principle aptamers are superior to antibodies in bioanalysis because they are stable against biodegradation and denaturation and provide a useful response against non immunogenic molecules.

Aptamers conjugated with NPs can be employed for the recognition of targets by exploiting conformational changes of the molecular structure when a variation in their local environment takes place because these changes alter the emission properties of the corresponding luminescent labels [66]. In this sense, different types of conjugation between NPs and aptamers have been reported for bioanalytical applications, including direct covalent linkage (through the use of heterobifunctional linkers) and non-covalent interactions (e.g. electrostatic interactions, groove binding, intercalation or complementary single-strand DNA binding) [67, 68].

Both colorimetric and fluorescent highly sensitive biosensors, based on aptamers conjugated to AuNPs, have been developed and reported for the detection of specific oligonucleotide sequences. There, aptamers act as functional targeting molecules while AuNP act as indicators. Thus, when the target sequence is present, the NPs aggregate and a colour change is observed [69].

Anti-thrombin aptamer has been widely used to detect thrombin [65]. It has been evaluated in different formats taking advantage of the fact that each thrombin molecule interacts with two thrombin aptamers. In this sense, Willner and co-workers functionalized AuNPs with an anti-thrombin aptamer, and the presence of thrombin produced turbidity in the NP solution as consequence of the generation of aggregates [70]. Another approach for the detection of thrombin designed by Becker et al. was based on the immobilization of aptamers onto a glass surface. After carrying out a sandwich format binding assay, functionalized AuNPs could be localized on the glass surface for colorimetric detection [71]. Later, in 2008, Jana and Ying improved this methodology by using a nitrocellulose membrane for the immobilization and detection [72]. Recently, other types of NPs such as gold nanorods have been used to carry out the specific aptamer–thrombin recognition [73].

AuNPs conjugated to aptamers have also been used in the development of bioassays for determination of cancer biomarkers, proteins and disease cells. As an example, Chang and co-workers employed AuNPs modified with an aptamer to detect platelet-derived growth factors (PDGFs) by monitoring a visible red-to-purple colour change that, once again, occurs as a result of aggregation [74]. A

schematic representation of the aggregation of Apt-AuNPs in the presence of PDGFs at different concentrations is given in Fig. 4. Detection of the protein IgE was also carried out in a new working mechanism named hairpin sticky-end pairing induced AuNP assembly based on the discovery of unique aggregation behaviour of aptamer-functionalized AuNPs [75]. The use of AuNPs conjugated with the corresponding aptamers allowed the development of a direct colorimetric assay for disease cells, which showed a distinct colour change while healthy cells did not change their colour [76].

Recent advances in this field have given rise to a multiplexed system for the simultaneous detection of several analytes (adenosine, cocaine and potassium ions). For this purpose, ssDNAs were co-assembled at the surface of AuNPs. The sequences of these three strands are complementary to those of three aptamers labelled with different dyes (one for each analyte); then hybridization with their complementary sequences takes place at the surface of AuNPs, generating the multicolour gold nanoprobe [77].

Quantum dots and AuNPs have also been used in combination with aptamers to develop different bioassays. Early research includes the bioconjugation of aptamers with QDs to detect thrombin by using a competition assay format, in which aptamer-QDs are hybridized with complementary ssDNA labelled with an acceptor dye: the induced fluorescence quenching of QDs by thrombin which displaces the labelled ssDNA is restored and so thrombin concentrations are measured [78].

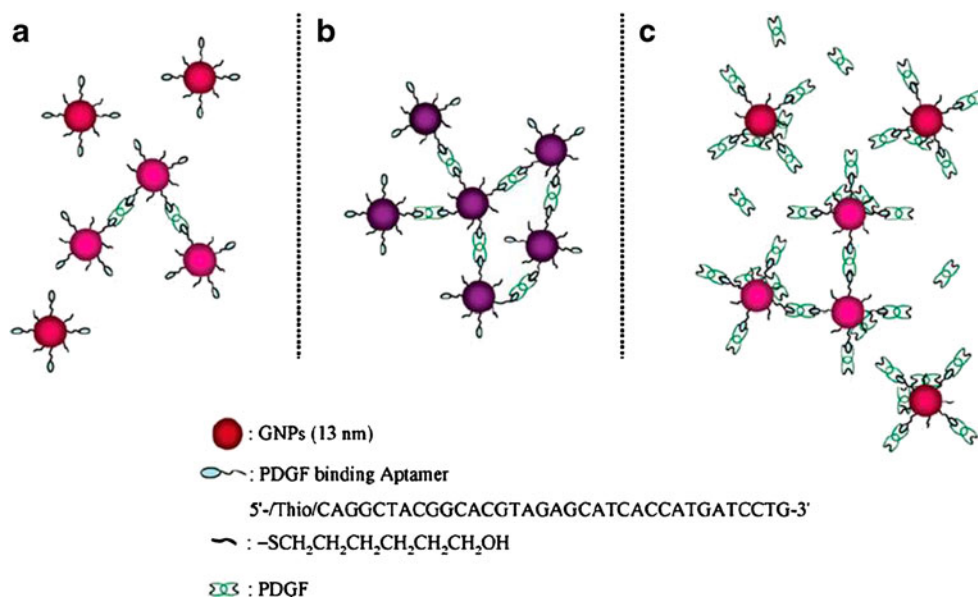
The use of QD-aptamer conjugates combined with FRET has also been used for detection of a tumour biomarker, the glycoprotein MUC1. In this approach,

quantitative detection of MUC1 is reported by using QDs-labelled DNA and a DNA strand containing aptameric region for MUC1 and a strand with a quencher partially prehybridized. In the absence of the biomarker, strong fluorescence intensity of the QD was observed. The presence of MUC1 produces a successive decrease of fluorescence intensity because MUC1 binds to the aptamer strand in a way that the donor and acceptor are brought into close proximity and so an efficient FRET process occurs [79].

Semiconductor QDs and AuNPs have also been used together, combined with aptamers, in the development of FRET-based bioassays: singly-labelled QDs plus AuNPs containing complementary DNA oligonucleotides were used to develop a fluorescence competition assay for DNA detection. In that assay, QD fluorescence emission was quenched due to the close contact with AuNP after DNA hybridization. The presence of higher amounts of complementary oligonucleotides without acceptor molecule brought about a release of the AuNP from the QD and the consequent QD fluorescence regeneration that was measured [80]. The same concept and format were also employed for the detection of avidin [81] and glycoproteins [82].

In the last few years, the optical properties of QDs have also been exploited for DNA labelling and for the development of new DNA-based microarrays, particularly aimed at the detection of a great number of analytes simultaneously (multiplex determination). As an example, different colour QDs were used for the detection of single-nucleotide polymorphism in human oncogene p53 and for the simultaneous detection of the hepatitis B and the hepatitis C virus in microarray configurations [83].

**Fig. 4** Schematic representation of the aggregation of Apt-GNPs with PDGFs at **a** low, **b** medium and **c** high concentrations. (Reprinted with permission from REFERENCE [74]. Copyright 2005 American Chemical Society)





One important advantage of the use of aptamers as recognition elements is the possibility to carry out the discrimination of single-base-mismatched target DNA. Kim et al. proposed the use of different sized QDs conjugated to different ssDNA which possess a quencher at the end of the sequence. When the target was not complementary, the hybridization process between DNA strands was not complete and, thus, donor and acceptor were in close proximity, giving rise to a fluorescence decrease [84]. This approach is also the basis of the research developed by Zhang and Johnson to study the sequence-specific interaction between Rev and RRE, essential for the expression of the structural genes and for HIV replication. Rev is an HIV-1 regulatory protein that specifically binds the RNA molecule in the RRE region of the HIV *env* gene. Specific RNA (containing RRE region) attached to QDs was conjugated with Cy5-labelled Rev peptide. Therefore, FRET interactions were produced, and QD photoluminescence was quenched as peptide concentration increased [85].

## Conclusions and future prospects

Although the use of nanoparticles as labels in bioanalysis is still in its infancy, nanoparticles offer a powerful detection approach in optical imaging and biosensing assays for proteomics and genomics applications. The initial challenge of achieving proper coating of the nanoparticles to preserve their stability, water solubility and ability to label targets is slowly being met. A great deal of progress has been made on this front in the last years and new reagent sets should eventually be effective for multiparameter detection (multiplexed detection) with microarray devices. Continuous advances in the synthesis of nanoparticles and in surface chemistry for tailored modifications have improved the reliability of nanoparticle-based reagents for bioassays. Further progress is expected to push detection limits further into the sub-femtomolar range (or lower) and lead to development of new assay formats for multiplex determinations, particularly of proteins.

An important issue to be considered regarding the use of nanoparticles, particularly for in vivo applications, is their eventual toxicity and biocompatibility. In fact, actual applications of QDs for in vivo applications are hindered by the inherent chemical cytotoxicity expected from the individual ions (such as  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Se}^{2+}$  and  $\text{Te}^{2+}$ ) that can be leached out from the core of the QDs. Novel synthetic routes to QDs, their encapsulation in appropriate inert matrices or the modification of their surface with polymeric layers are some approaches that are being studied in order to reduce the toxicity of such high-performance nanocrystals. Of course, another alternative could be the development of alternative low-toxicity nanomaterials, such

as carbon dots, gold nanoparticles or doped silica nanoparticles, which have demonstrated a lower toxicity and higher biocompatibility. In any case, nowadays there is still a great controversy about the toxicity linked to such nanoparticles and exhaustive toxicological studies are urgently demanded.

Despite the outstanding potential of NPs in bioanalytical research, there are still many challenges that pose significant barriers to their further applications and development. For example, as the properties of nanoparticles are strongly dependent on the nanoparticle size, nanoparticle materials synthesis (with reproducible properties for any reliable applications) should carefully and precisely control the nanoparticle size. Unfortunately, we must acknowledge, after a few decades of research endeavour in nanoparticle synthesis, that reproducibility of nanoparticle production remains a major issue in nanoparticle research.

A second key point and challenge is how to avoid loss of activity of the biomolecules once they are conjugated to nanoparticles. The loss of activity of biomolecules upon adsorption to an interface such as air–water or water–solid substrate has been a long-standing problem.

Another issue concerning nanoparticle bioconjugates is the number of biomolecules attached per nanoparticle. Usually multiple biomolecules can be attached to an individual nanoparticle and, in fact, the number of biomolecules attached per particle cannot be controlled appropriately so far (in part due to our relatively poor control on the nanoparticle size via wet chemical synthesis as mentioned previously).

Let us conclude by saying that much work must be carried out if the chemistry and physics of nanocrystals are to be understood, if the general concepts for bioconjugation are to be established, and if new NPs methods, taking advantage of their discussed unique features, are to be developed to solve present bioanalysis challenges posed by biology, biochemistry and medicine.

**Acknowledgements** Financial support from project CTQ2006-02309/BQU (Spanish Ministry of Science and Innovation cofinanced by the EU FEDER Programme) is gratefully acknowledged.

## References

1. Waggoner A (2006) Fluorescent labels for proteomics and genomics. *Curr Opin Chem Biol* 10:62–66
2. Sharma P, Brown S, Walter G, Santra S, Moudgil B (2006) Nanoparticles for bioimaging. *Adv Colloid Interface Sci* 123:471–485
3. Willard DM (2003) Nanoparticles in bioanalytics. *Anal Bioanal Chem* 376:284–286
4. Gill R, Zayats M, Willner I (2008) Semiconductor quantum dots for bioanalysis. *Angew Chem Int Ed Engl* 47:7602–7625
5. Sperling RA, Rivera Gil P, Zhang F, Zanella M, Parak WJ (2008) Biological applications of gold nanoparticles. *Chem Soc Rev* 37:1896–1908

6. Mirkin CA, Letsinger RL, Mucic RC, Storhoff JJ (1996) A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials. *Nature* 382:607–609
7. Taton TA, Mirkin CA, Letsinger RL (2000) Scanometric DNA array detection with nanoparticle probes. *Science* 289(8):1757–1760
8. He L, Musick MD, Nicewarner SR, Salinas FG, Benkovic SJ, Natan MJ, Keating CD (2000) Colloidal Au-enhanced surface plasmon resonance for ultrasensitive detection of DNA hybridization. *J Am Chem Soc* 122:9071–9077
9. Elghanian R, Storhoff JJ, Mucic RC, Letsinger RL, Mirkin CA (1997) Selective colorimetric detection of polynucleotides based on the distance-dependent optical properties of gold nanoparticles. *Science* 277:1078–1081
10. Hirsch LR, Jackson JB, Lee A, Halas NJ, West JL (2003) A whole blood immunoassay using gold nanoshells. *Anal Chem* 75:2377–2381
11. Wang H, Huff TB, Zweifel DA, He W, Low PS, Wei A, Cheng J (2005) In vitro and in vivo two-photon luminescence imaging of single gold nanorods. *PNAS* 102:15752–15756
12. He H, Xie C, Ren J (2008) Nonbleaching fluorescence of gold nanoparticles and its applications in cancer cell imaging. *Anal Chem* 80:5951–5957
13. Wu X, Ming T, Wang X, Wang P, Wang J, Chen J (2010) High-photoluminescence-yield gold nanocubes: for cell imaging and photothermal therapy. *ACS Nano* 4:113–120
14. Lin CJ, Yang T, Lee C, Huang SH, Sperling RA, Zanella M, Li JK, Shen J, Wang H, Yeh H, Parak WJ, Chang WH (2009) Synthesis, characterization, and bioconjugation of fluorescent gold nanoclusters toward biological labeling applications. *ACS Nano* 3:395–401
15. Bruchez M Jr, Moronne M, Gin P, Weiss S, Alivisatos AP (1998) Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. *Science* 281:2013–2016
16. Chan WCW, Nie SM (1998) Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection. *Science* 281:2016–2018
17. Wagner MK, Li F, Li J, Li X, Le XC (2010) Use of quantum dots in the development of assays for cancer biomarkers. *Anal Bioanal Chem* 397:3213–3224
18. Am S, Ruan G, Rhyner MN, Nie S (2006) Engineering luminescent quantum dots for in vivo molecular and cellular imaging. *Ann Biomed Eng* 34:3–14
19. Wang C, Gao X, Su X (2010) In vitro and in vivo imaging with quantum dots. *Anal Bioanal Chem* 397:1397–1415
20. Wu XY, Liu HJ, Liu JQ, Haley KN, Treadway JA, Larson JP, Ge NF, Peale F, Bruchez MP (2002) Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots. *Nat Biotechnol* 21:41–46
21. Aswathy RG, Yoshida Y, Maekawa T, Kumar DS (2010) Near infrared quantum dots for deep tissue imaging. *Anal Bioanal Chem* 397:1417–1435
22. Delehanty JB, Bradburne CE, Boeneman K, Susumu K, Farrell D, Mei BC, Blanco-Canosa JB, Dawson G, Dawson PE, Mattoussi H, Medintz IL (2010) Delivering quantum dot-peptide bioconjugates to the cellular cytosol: escaping from the endolysosomal system. *Integr Biol* 2:265–277
23. Smith AM, Duan H, Mohs AM, Nie S (2008) Bioconjugated quantum dots for in vivo molecular and cellular imaging. *Adv Drug Deliv Rev* 60:1226–1240
24. Kobayashi H, Hama Y, Koyama Y, Barrett T, Regino CAS, Urano Y, Choyke PL (2007) Simultaneous multicolor imaging of five different lymphatic basins using quantum dots. *Nano Lett* 7:1711–1716
25. Hikage M, Gonda K, Takeda M, Kamei T, Kobayashi M, Kumasaka M, Watanabe M, Satomi S, Ohuchi N (2010) Nano-imaging of the lymph network structure with quantum dots. *Nanotechnology* 21:185103 (8pp)
26. Peng CW, Li Y (2010) Application of quantum dots-based biotechnology in cancer diagnosis: current status and future perspectives. *J Nanomater* 676839 (11pp)
27. Åkerman ME, Chan WCW, Laakkonen P, Bhatia SN, Ruoslahti E (2002) Nanocrystal targeting in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:12617–12621
28. Dubertret B, Skourides P, Norris DJ, Noireaux V, Brivanlou AH, Libchaber A (2002) In vivo imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles. *Science* 298:1759–1762
29. Gao X, Cui Y, Levenson RM, Chung LWK, Nie S (2004) In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots. *Nat Biotechnol* 22(8):969–976
30. Yang L, Mao H, Wang YA, Cao Z, Peng X, Wang X, Duan H, Ni C, Yuan Q, Adams G, Smith MQ, Wood WC, Gao X, Nie S (2009) Single chain epidermal growth factor receptor antibody conjugated nanoparticles for in vivo tumor targeting and imaging. *Small* 5:235–243
31. Yu X, Chen L, Li K, Li Y, Luo S, Liu J, Deng L, Pang D, Wang (2007) Immunofluorescence detection with quantum dot bioconjugates for hepatoma in vivo. *J Biomed Opt* 12:014008
32. Liu J, Lau SK, Varma VA, Moffitt RA, Caldwell M, Liu T, Young AN, Petros JA, Osunkoya AO, Krogstad T, Leyland-Jones B, Wang MD, Nie S (2010) Molecular mapping of tumor heterogeneity on clinical tissue specimens with multiplexed quantum dots. *ACS Nano* 4:2755–2765
33. Kuno M, Fromm DP, Hamann HF, Gallagher A, Nesbitt DJ (2000) Hydrolysis of sulfur trioxide to form sulfuric acid in small water clusters. *J Chem Phys* 112:3117–3120
34. Chatterjee DK, Rufaihah AJ, Zhang Y (2008) Upconversion fluorescence imaging of cells and small animals using lanthanide doped nanocrystals. *Biomaterials* 29:937–943
35. Wang H, Nann T (2009) Monodisperse upconverting nanocrystals by microwave-assisted synthesis. *ACS Nano* 3:3804–3808
36. Kobayashi H, Kosaka N, Ogawa M, Morgan NY, Smith PD, Murray CB, Ye X, Collins J, Kumar GA, Belld H, Choyke PL (2009) In vivo multiple color lymphatic imaging using upconverting nanocrystals. *J Mater Chem* 19:6481–6484
37. Hilderbrand SA, Shao F, Salthouse C, Mahmoodb U, Weissleder R (2009) Upconverting luminescent nanomaterials: application to in vivo bioimaging. *Chem Commun* 4188–4190
38. Ungun B, Prud'homme RK, Budijono SJ, Shan J, Lim SF, Ju Y, Austin R (2009) Nanofabricated upconversion nanoparticles for photodynamic therapy. *Opt Express* 17:80–86
39. Chen Z, Che H, Hu H, Yu M, Li F, Zhang Q, Zhou Z, Yi T, Huang C (2008) Versatile synthesis strategy for carboxylic acid functionalized with upconverting nanophosphors as biological labels. *J Am Chem Soc* 130:3023–3029
40. Sun Y, Zhou B, Lin Y, Wang W, Fernando KAS, Pathak P, Mezziani MJ, Harruff BA, Wang X, Wang H, Luo PG, Yang H, Kose ME, Chen B, Veca LM, Xie S (2006) Quantum-sized carbon dots for bright and colorful photoluminescence. *J Am Chem Soc* 128:7756–7757
41. Cao L, Wang X, Mezziani MJ, Lu F, Wang H, Luo PG, Lin Y, Harruff BA, Veca LM, Murria D, Xie S, Sun Y (2007) Carbon dots for multiphoton bioimaging. *J Am Chem Soc* 129:11318–11319
42. Yang S, Wang X, Wang H, Lu F, Luo PG, Cao L, Mezziani MJ, Liu J, Liu Y, Chen M, Huang Y, Sun Y (2009) Carbon dots as nontoxic and high-performance fluorescence imaging agents. *J Phys Chem C* 113:18110–18114
43. Yang S, Cao L, Luo PG, Lu F, Wang X, Wang H, Mezziani MJ, Liu Y, Qi G, Sun Y (2007) Carbon dots for optical imaging in vivo. *J Am Chem Soc* 131:11308–11309
44. Li L, Song J, Li S, Fan C (2009) Biomolecular sensing via coupling DNA-based recognition with gold nanoparticles. *J Phys D Appl Phys* 42:203001–203012
45. Wang W, Chen C, Qian M, Zhao X (2008) Aptamer biosensor using gold nanoparticles. *Anal Bioanal Chem* 373:213–219
46. Huang CC, Chiang K, Lin ZH, Lee KH, Chang HT (2008) Bioconjugated gold nanodots and nanoparticles for protein assays based on photoluminescence quenching. *Anal Chem* 80:1497–1504

47. Mendintz IL, Mattoussi H (2009) Quantum dot-based resonance energy transfer and its growing application in biology. *Phys Chem Chem Phys* 11:17–45
48. Medintz IL, Clapp AR, Mattoussi H, Goldman ER, Fisher B, Mauro JM (2003) Self-assembled nanoscale biosensors based on quantum dot FRET donors. *Nat Mater* 2:630–638
49. Dong H, Gao W, Yan F, Ji H, Ju H (2010) Fluorescence resonance energy transfer between quantum dots and graphene oxide for sensing biomolecules. *Anal Chem* 82:5511–5517
50. Medintz IL, Clapp AR, Brunel FM, Tiefenbrunn T, Uyeda HT, Chang EL, Deschamps JR, Dawson PE, Mattoussi H (2006) Proteolytic activity monitored by fluorescence resonance energy transfer through quantum-dot-peptide conjugates. *Nat Mater* 5:581–589
51. Suzuki M, Husimi Y, Komatsu H, Suzuki K, Douglas KT (2008) Quantum dot FRET biosensors that respond to pH, to proteolytic or nucleolytic cleavage, to DNA synthesis, or to a multiplexing combination. *J Am Chem Soc* 130:5720–5725
52. Geissler D, Charbonniere LJ, Ziessel RF, Butlin NG, Löhmansröben H-G, Hildebrandt N (2010) Quantum dot biosensors for ultrasensitive multiplexed diagnostics. *Angew Chem Int Ed Engl* 49:1396–1401
53. Zhang C-Y, Yeh H-C, Kuroki MT, Wang T (2005) Single quantum dot-based DNA nanosensor. *Nat Mater* 4:826–831
54. Price CP, Newman DJ (1997) Principles and practice of immunoassay. Stockton, New York
55. Soman CP, Giorgio TD (2008) Quantum dot self-assembly for protein detection with sub-picomolar sensitivity. *Langmuir* 24:4399–4404
56. Goldman ER, Clapp AR, Anderson GP, Uyeda HT, Mauro JM, Medintz IL, Mattoussi H (2004) Multiplexed toxin analysis using four colors of quantum dot fluororeagents. *Anal Chem* 76:684–688
57. Yang LJ, Li YB (2006) Simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium using quantum dots as fluorescence labels. *Analyst* 131:394–401
58. Wei Q, Lee M, Yu X, Lee EK, Seong GH, Choo J, Cho YW (2006) Development of an open sandwich fluorimmunoassay based on fluorescence resonance energy transfer. *Anal Biochem* 358:31–37
59. Wang Z, Levy R, Fernig DG, Mathias Brust M (2006) Kinase-catalyzed modification of gold nanoparticles: a new approach to colorimetric kinase activity screening. *J Am Chem Soc* 128:2214–2215
60. Choi Y, Ho N-H, Tung C-H (2007) Sensing phosphatase activity by using gold nanoparticles. *Angew Chem Int Ed Engl* 46:707–709
61. Zhao W, Chiuman W, Lam JCF, Brook MA, Li Y (2007) Simple and rapid colorimetric enzyme sensing assays using non-crosslinking gold nanoparticle aggregation. *Chem Commun* 3729–3731
62. Maier I, Morgan MRA, Lindner W, Pittner F (2008) Optical resonance-enhanced absorption-based near-field immunochip biosensor for allergen detection. *Anal Chem* 80:2694–2703
63. Algar WR, Krull UJ (2007) Towards multi-colour strategies for the detection of oligonucleotide hybridization using quantum dots as energy donors in fluorescence resonance energy transfer (FRET). *Anal Chim Acta* 581:193–201
64. Eastman PS, Ruan WM, Doctolero M, Nuttall R, Feo GD, Park JS, Chu JFS, Cooke P, Gray JW, Li S, Chen FQF (2006) Qdot nanobarcode for multiplexed gene expression analysis. *Nano Lett* 6:1059–1064
65. Tombelli S, Minunni M, Mascini M (2007) Aptamers-based assays for diagnostics, environmental and food analysis. *Biomol Eng* 24:191–200
66. Wang G, Wang Y, Chen L, Choo J (2010) Nanomaterials-assisted aptamers for optical sensing. *Biosens Bioelectron* 25:1859–1868
67. De M, Ghosh PS, Rotello VM (2008) Applications of nanoparticles in biology. *Adv Mater* 20:4225–4241
68. Mairal T, Özalp VC, Lozano-Sánchez P, Mir M, Katakis I, O'Sullivan CK (2008) Aptamers: molecular tools for analytical applications. *Anal Bioanal Chem* 390:989–1007
69. Han MS, Lytton-Jean AKR, Oh BK, Heo J, Mirkin CA (2006) Colorimetric screening of DNA-binding molecules with gold nanoparticles probes. *Angew Chem Int Ed Engl* 45:1807–1810
70. Pavlov V, Xiao Y, Shlyahovsky B, Willner I (2004) Aptamer-functionalized Au nanoparticles for the amplified optical detection of thrombin. *J Am Chem Soc* 126:11768–11769
71. Becker RC, Spencer FA (1998) Thrombin: structure, biochemistry, measurement, and status in clinical medicine. *J Thromb Thrombolysis* 5:215–229
72. Jana NR, Ying JY (2008) Synthesis of functionalized Au nanoparticles for protein detection. *Adv Mater* 20:430–434
73. Zhen SJ, Huang CZ, Wang J, Li YF (2009) End-to-end assembly of gold nanorods on the basis of aptamer-protein. *J Phys Chem C* 113:21543–21547
74. Huang CC, Huang YF, Cao Z, Tan W, Chang HT (2005) Aptamer-modified gold nanoparticles for colorimetric determination of platelet-derived growth factors and their receptors. *Anal Chem* 77:5735–5741
75. Wu ZS, Lu HX, Liu XP, Hu R, Zhou H, Shen G, Yu RQ (2010) An inhibitory effect of target binding on hairpin aptamer sticky-end pairing-induced gold nanoparticles assembly for light-up colorimetric protein assay. *Anal Chem* 82:3890–3898
76. Medley CD, Smith JE, Tang Z, Wu Y, Bamrungsap S, Tan W (2008) Gold nanoparticle-based colorimetric assay for the direct detection of cancerous cells. *Anal Chem* 80:1067–1072
77. Zhang J, Wang L, Zhang H, Boey F, Song S, Fan C (2010) Aptamer-based multicolour fluorescent gold nanoprobe for multiplex detection in homogeneous solution. *Small* 6:201–204
78. Levi M, Cater SF, Ellington AD (2005) Quantum-dot aptamer beacons for the detection of proteins. *Chembiochem* 6:2163–2166
79. Cheng AKH, Su H, Wang YA, Yu HZ (2009) Aptamer-based detection of epithelial tumor marker Mucin 1 with quantum dot-based fluorescence readout. *Anal Chem* 81:6130–6139
80. Dyakusha L, Yin H, Jaiswal S, Brown T, Baumberg JJ, Booy FP, Melvin T (2005) Quenching of CdSe quantum dot emission, a new approach for biosensing. *Chem Commun* 3201–3203
81. Oh E, Hong MY, Lee D, Nam SH, Yoon HC, Kim HS (2005) Inhibition assay of biomolecules based on fluorescence resonance energy transfer (FRET) between quantum dots and gold nanoparticles. *J Am Chem Soc* 127:3270–3271
82. Oh E, Lee D, Kim YP, Cha SY, Oh DB, Kang HA, Kim J, Kim HS (2006) Nanoparticle-based energy transfer for rapid and simple detection of protein glycosylation. *Angew Chem Int Ed Engl* 45:7959–7963
83. Gerion D, Chen F, Kannan B, Fu A, Parak WJ, Chen DJ, Majumdar A, Alivisatos AP (2003) Room-temperature single-nucleotide polymorphism and multiallele DNA detection using fluorescent nanocrystals and microarrays. *Anal Chem* 75:4766–4772
84. Kim JH, Chaudhary S, Ozkan M (2007) Multicolour hybrid nanoprobe of molecular beacon conjugated quantum dots: FRET and gel electrophoresis assisted target DNA detection. *Nanotechnology* 18:195105
85. Zhang CY, Johnson LW (2006) Quantum-dot-based nanosensor for RRE IIB RNA–Rev peptide interaction assay. *J Am Chem Soc* 128:5324–5325
86. Fernandez-Argüelles MT, Costa Fernández JM, Pereiro R, Sanz Medel A (2010) Chap. 12, The supramolecular chemistry of organic–inorganic hybrid materials, John Wiley & Sons, Inc
87. Rurack K, Martínez-Mañez R (2010) Chap. 12, The supramolecular chemistry of organic–inorganic hybrid materials, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey