



Universidad de Oviedo

**MÁSTER EN CIENCIAS ANALÍTICAS Y  
BIOANALÍTICAS**

**Trabajo Fin de Máster**

**Síntesis de nanopartículas metálicas  
funcionalizadas: aplicación al análisis  
bioquímico, posibilidades de amplificación  
para biomarcadores**

**Marta García Cortés  
Julio 2013, Oviedo**

---

<b>A. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
A.1. FLUORÓFOROS DE NUEVA GENERACIÓN: QUANTUM DOTS .....	2
A.1.1. Quantum Dots: definición y propiedades.....	2
A.1.2. Propiedades fotoluminiscentes de los QDs.....	4
A.1.3. Quantum dots fosforescentes .....	6
A.1.3.1. Escenario I: Los estados excitados del $Mn^{2+}$ debidos a procesos de fotoionización, son los más bajos en energía y se encuentran dentro del salto de banda del semiconductor.....	6
A.1.3.2. Escenario II: Los estados excitados del semiconductor son los más bajos en energía (estados excitados de $Mn^{2+}$ se encuentran fuera del salto de banda). .....	7
A.1.3.3. Escenario III: Los estados excitados del $Mn^{2+}$ son los más bajos en energía y se encuentran dentro del salto de banda del semiconductor. ....	8
A.1.4. Solubilización de quantum dots en medios acuosos.....	10
A.1.4.1. Estrategias de solubilización y modificación superficial.....	11
A.1.4.2. Tipos de ligandos empleados en la solubilización de QDs .....	13
A.2. APLICACIONES BIOANALÍTICAS DE LOS QDS: DESARROLLO DE INMUNOENSAYOS.....	15
A.2.1. Generalidades de los inmunoensayos .....	16
A.2.2. Empleo de los QDs en el desarrollo de fluoroinmunoensayos.....	17
A.2.3. Inmunoensayos con nanomateriales como marcadores: amplificación de la señal.....	18
A.3. ANTÍGENO PROSTÁTICO ESPECÍFICO .....	19
<b>B. OBJETIVO</b> .....	21
<b>C. EXPERIMENTAL</b> .....	24
C.1. INSTRUMENTACIÓN Y REACTIVOS.....	25
C.1.1. Instrumentación empleada.....	25
C.1.2. Material.....	25
C.1.3. Reactivos y disoluciones .....	26
C.2. PROCEDIMIENTO DE SÍNTESIS DE QUANTUM DOTS FOSFORESCENTES.....	27

---

C.3. OBTENCIÓN DE ZNS QDS RECUBIERTOS CON DHLA.....	29
C.3.1. Reducción del ácido lipoico .....	30
C.3.2. Proceso de intercambio de ligandos.....	30
C.4. CARACTERIZACIÓN DE LOS QDS FOSFORESCENTES .....	31
C.4.1. Tamaño y forma.....	31
C.4.2. Asymmetric Flow Field-Flow Fractionation (AF4).....	33
C.4.3. Características fotoluminiscentes.....	35
C.4.3.1. Efecto del pH.....	37
C.4.3.2. Presencia de átomos pesados.....	38
C.4.3.3. Efecto del O <sub>2</sub> disuelto.....	38
C.4.3.4. Efecto de la fotoactivación .....	39
C.4.4. Estabilidad a largo a plazo .....	41
C.5. DESARROLLO DE UN INMUNOENSAYO PARA LA DETECCIÓN DE PSA.....	42
C.5.1. Bioconjugación QDs-anticuerpo .....	42
C.5.1.1. Bioconjugación vía carbodiimida .....	42
C.5.1.2. Funcionalidad del bioconjugado y relación QD-Ab .....	43
C.5.2. Diseño del inmunoensayo para PSA .....	46
C.5.2.1. Consideraciones preliminares.....	46
C.5.2.2. Procedimiento experimental .....	47
C.5.3. Fosfoinmunoensayo.....	47
C.5.4. Amplificación elemental y medida por ICPMS .....	48
C.6. AMPLIFICACIÓN METÁLICA.....	49
<b>D. CONCLUSIONES.....</b>	<b>52</b>
<b>E. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>55</b>

## Índice de figuras

Figura 1. Distribución de niveles de energía de un semiconductor en función del número de átomos conectados <sup>2</sup> .....	3
Figura 2. Sulfuro de plomo (PbS): a) como galena b) como PbS QDs fluorescentes.....	3
Figura 3. Espectros de absorción (A) y emisión (B) de quantum dots de CdSe/ZnS de diferentes tamaños.....	5
Figura 4. Efecto del Mn <sup>2+</sup> en las propiedades fotofísicas de los nanocristales de ZnO <sup>11</sup> ..	7
Figura 5. Diferentes emisiones que podemos encontrar en función del diámetro de la nanopartícula.....	8
Figura 6. Esquema de la transferencia de energía que se produce en el QD cuando se introducen impurezas de Mn <sup>2+</sup> en su estructura <sup>11</sup> .....	9
Figura 7: recubrimientos A) L-cisteína B) ácido 3-mercaptopropiónico.....	28
Figura 8. Proceso de síntesis de ZnS QDs dopados con Mn <sup>2+</sup> y solubilizados con MPA..	29
Figura 9. Intercambio de ligandos MPA a DHLA.....	31
Figura 10. Imagen HRTEM de ZnS QDs dopados con Mn <sup>2+</sup> y recubiertos con MPA.....	32
Figura 11. Medidas radio hidrodinámico de QDs de ZnS dopados con Mn <sup>2+</sup> mediante DLS: A) recubiertas con MPA B) recubiertas con DHLA.....	33
Figura 12. Fractograma de ZnS QDs dopados con Mn <sup>2+</sup> .....	34
Figura 13. Espectro de emisión fosforescente de una disolución de Mn <sup>2+</sup> : ZnS QDs.....	35
Figura 14. Espectro de emisión fluorescente de una disolución de Mn <sup>2+</sup> : ZnS QDs.....	36
Figura 15. Espectro de absorbancia UV-Vis de una disolución de Mn <sup>2+</sup> : ZnS QDs.....	36
Figura 16. Curva de desactivación de la emisión fosforescente de una disolución de Mn <sup>2+</sup> : ZnS QDs.....	37
Figura 17. A) Variación de la emisión fosforescente en función del pH B) Tiempos de vida media de disoluciones de QDs fosforescentes a diferentes pHs. ....	37
Figura 18. pka grupos ácido y tiol DHLA.....	38
Figura 19. Emisión fosforescente a concentraciones crecientes de sulfito como agente desoxigenante.....	39
Figura 20. Monitorización de la emisión fosforescente durante un periodo de fotoactivación: Mn <sup>2+</sup> : ZnS QDs con DHLA .....	40
Figura 21. Evaluación de la estabilidad a largo plazo .....	41

*Figura 22. Estrategia de bioconjugación mediante el uso de la química de EDC..... 42*

*Figura 23. Esquema de bioconjugación de ZnS QDs dopados con Mn<sup>2+</sup> al anticuerpo . 43*

*Figura 24. Esquema inmunoensayo ELISA espectrofotométrico ..... 44*

*Figura 25. Inmunoensayo espectrofotométrico obtenido para relaciones QDs: Ab 20:1 y 30:1 ..... 45*

*Figura 26. Medidas de fosforescencia en disolución para diferentes relaciones QDs: Ab 46*

*Figura 27. Esquema del inmunoensayo tipo sándwich para PSA ..... 47*

*Figura 28. Recta de calibrado de PSA para medidas de fosforescencia ..... 48*

*Figura 29. Recta de calibrado de PSA para medidas de fosforescencia ..... 49*

*Figura 30. Fotografías TEM Mn<sup>2+</sup>:ZnS QDs A)Tras amplificación con oro B) Tras amplificación con plata..... 50*

*Figura 31. Esquema del inmunoensayo con amplificación metálica..... 51*

## ***A. INTRODUCCIÓN***

## **A.1. FLUORÓFOROS DE NUEVA GENERACIÓN: QUANTUM DOTS**

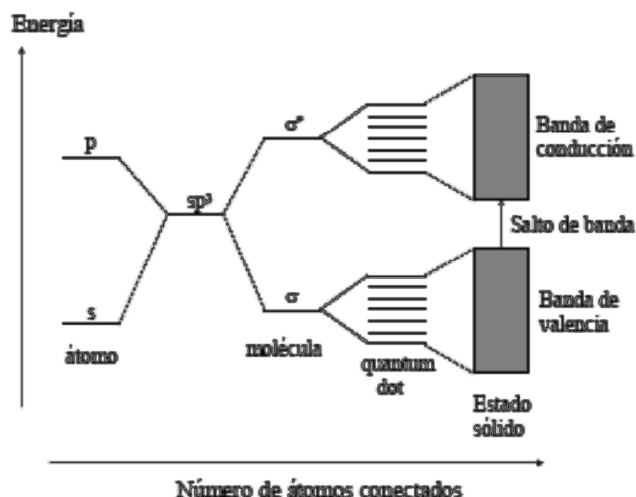
### **A.1.1. Quantum Dots: definición y propiedades**

Los Quantum Dots (QDs), conocidos también como puntos cuánticos, constituyen un grupo de nanoestructuras que se clasifican dentro de los nanomateriales en función de sus dimensiones como nanoestructuras cero-dimensionadas (0D), ya que todas ellas se encuentran en la escala nanométrica. Los QDs son nanocristales semiconductores coloidales, de forma aproximadamente esférica, con un diámetro de partícula típicamente entre 2-12 nm. Generalmente los QDs están constituidos por grupos entre cientos y miles de átomos de elementos pertenecientes a los grupos II-VI, III-V o IV de la tabla periódica<sup>1</sup>.

Este tipo de materiales semiconductores, con tamaños del orden de los nm, presentan una relación superficie/volumen muy elevada. Además, debido a su reducido tamaño sus propiedades están dominadas por efectos de confinamiento cuántico, ya que los electrones no se pueden mover libremente por el material. Esto implica que los niveles de energía del QD están cuantizados y relacionados con el tamaño físico del mismo, presentando un comportamiento intermedio entre el material a nivel macroscópico y a escala atómica.

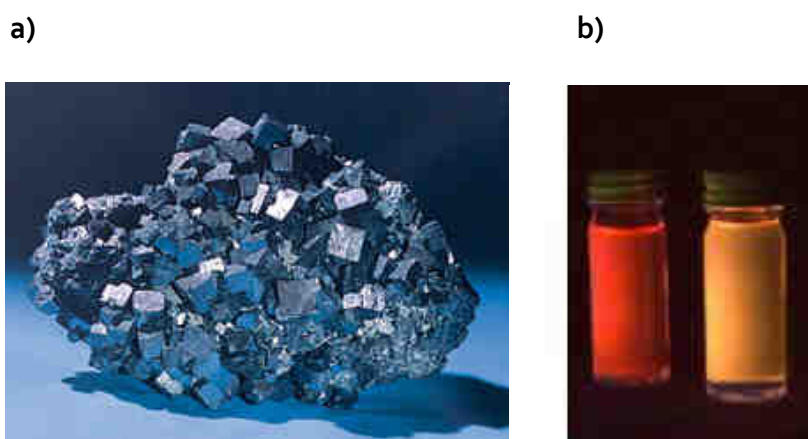
Los semiconductores macroscópicos se caracterizan por tener un "salto de banda" o "band-gap" cuya magnitud corresponde a la diferencia de energía entre la banda de conducción y la banda de valencia. Este valor es fijo para cada tipo de material y determina la energía mínima que deben poseer los electrones para poder pasar de la banda de valencia a la banda de conducción. Sin embargo, cuando sintetizamos estos materiales semiconductores a escala nanométrica, su tamaño es del orden de las longitudes de onda asociadas a los portadores de carga (electrones y huecos) y, como consecuencia, los niveles de energía de la partícula no pueden tomar cualquier valor arbitrario sino que están cuantizados. El sistema presenta entonces un espectro discreto de niveles de energía dependiente del tamaño del semiconductor. Como se puede ver en la figura 1, a medida que aumenta el número de átomos conectados, los niveles discretos típicos de los orbitales atómicos se convierten en bandas de energía (semiconductor convencional).

Así pues, para los QDs, por tanto, el salto de energía está ahora relacionado no sólo con la composición del material, sino también con el tamaño de la nanopartícula<sup>2</sup>, de manera que a medida que el tamaño de esta disminuye el "salto de banda" se incrementa.



**Figura 1.** Distribución de niveles de energía de un semiconductor en función del número de átomos conectados<sup>2</sup>.

El efecto de confinamiento cuántico que tiene lugar en los QDs es el responsable de las interesantes propiedades optoelectrónicas de estos nanomateriales semiconductores inorgánicos, que a escala macroscópica no muestran propiedades luminiscentes. Pero que, sin embargo, al sintetizarse con estas reducidas dimensiones presentan una intensa emisión fotoluminiscente<sup>3</sup>. A modo de ejemplo, en la figura 2 se recoge una fotografía del sulfuro de plomo a escala macroscópica (galena) y el mismo PbS sintetizado a escala nanométrica (QDs) en una suspensión coloidal, que presenta una intensa emisión luminiscente.



**Figura 2.** Sulfuro de plomo (PbS): a) como galena b) como PbS QDs fluorescentes



### **A.1.2. Propiedades fotoluminiscentes de los QDs**

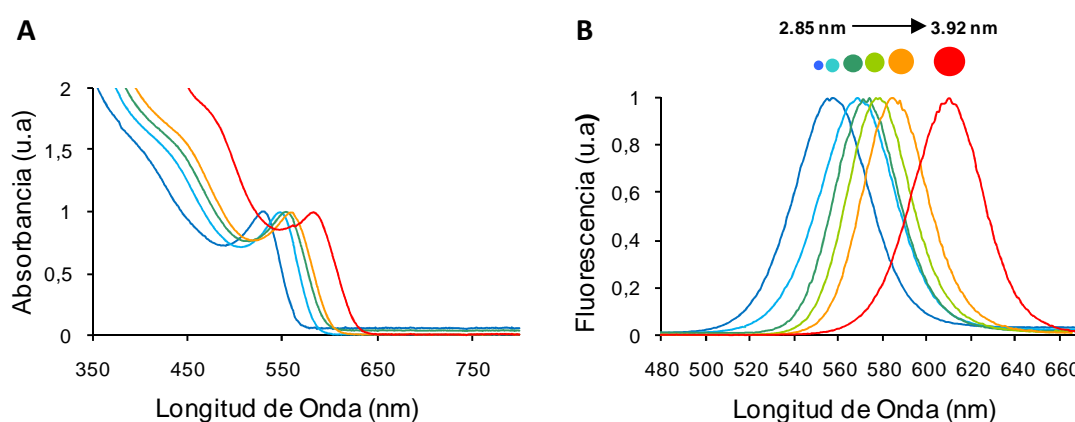
El proceso de emisión fotoluminiscente en los QDs ocurre tras varias etapas. En primer lugar, se produce la absorción de un fotón de radiación cuya energía es superior a la del salto de banda del semiconductor nanométrico, lo que da lugar a la formación de un par electrón/hueco (excitón o plasmón). En este tipo de nanomateriales, los espectros de absorción que se obtienen son generalmente anchos, ya que el proceso tiene mayor probabilidad de suceder a mayores energías (menores longitudes de onda). La recombinación del par/electrón está caracterizada por una vida media relativamente larga (mayor de 10 ns), dando lugar a la emisión de un fotón de menor energía que el absorbido (desplazamiento de Stokes), produciendo una banda de energía estrecha y simétrica.

Por tanto, los Quantum Dots se postulan como una nueva clase de luminóforos de extraordinario potencial para gran cantidad de aplicaciones bioanalíticas. Puesto que, además de poseer las ventajas de la detección de fluoróforos tradicionales en términos de sensibilidad y selectividad, dichas nanopartículas podrían minimizar los inconvenientes que se encuentran cuando se trabaja con los fluoróforos orgánicos comúnmente utilizados<sup>4</sup> debido a sus extraordinarias características luminiscentes, entre las que se destacan:

- Elevados rendimientos cuánticos, dando lugar a señales de emisión fluorescentes muy intensas.
- Largos tiempos de vida media del fenómeno luminiscente (10-50 ns).
- Mayor resistencia a fenómenos de photobleaching (fotodescomposición).
- Existe una gran separación entre las longitudes de onda de excitación y emisión (más de 100 nm).
- Presentan anchos espectros de absorción (figura 3A) y espectros de emisión luminiscente muy estrechos (anchuras de pico a la mitad del máximo de emisión entre 25-35 nm).
- Existe la posibilidad de controlar la longitud de onda de emisión desde el ultravioleta al infrarrojo modificando la composición y/o el tamaño del nanocrystal (figura 3B).

Estas últimas características, además de implicar un incremento en la sensibilidad y selectividad, permitirían el empleo de este tipo de fluoróforos como marcados en aplicaciones que involucren la monitorización de varios analitos simultáneamente (p.ej. en muestras biológicas). Debido a que estas nanopartículas poseen espectros de absorción anchos (fig 3A), es posible excitar al mismo tiempo QDs cuya emisión se encuentra a diferentes longitudes de

onda<sup>5</sup>. Gracias a que estas bandas son muy estrechas, es posible resolverlas y relacionar cada longitud de onda de emisión con un analito. Ambas propiedades son de gran valor para lograr llevar a cabo ensayos multianalito, empleando distintos QDs de diferentes tamaños como indicadores de distintos analitos en una muestra dada. Hoy en día, los ensayos "multiplex" (multianalito) están cobrando mucha relevancia, particularmente en química analítica, ya que la determinación simultánea de diferentes marcadores en muestras biológicas permite un diagnóstico más preciso y más rápido. Además se reduce el volumen de muestra necesario (en muestras biológicas muchas veces se dispone de cantidad muy pequeña), así como el tiempo de análisis.



**Figura 3. Espectros de absorción (A) y emisión (B) de quantum dots de CdSe/ZnS de diferentes tamaños.**

A pesar de las excelentes ventajas que presentan estos semiconductores como nuevos fluoróforos, también se deben indicar algunos de sus inconvenientes. El primero de ellos es la dificultad que se encuentra para compatibilizar los QDs con medios acuosos y biológicos<sup>6</sup>, además de que en los procesos de síntesis más comunes se utilizan disolventes orgánicos y precursores altamente reactivos. Por otro lado, es necesario mencionar la posible toxicidad que pueden presentar algunos de estos nanomateriales cuando se emplean en aplicaciones "in vivo". Esta posible toxicidad podría atribuirse no sólo a la posibilidad de que estas nanoestructuras puedan atravesar las barreras celulares, sino también a su composición<sup>7</sup>.

En esta línea, existe un gran interés investigador en la síntesis y modificación superficial de los QDs, buscando nanopartículas cada vez más estables, con baja-nula citotoxicidad y con emisión luminiscente mejorada, de cara a futuras aplicaciones en bioanálisis. En este contexto, una de las estrategias que se están investigando actualmente, como alternativa al empleo de quantum dots de CdSe fluorescentes (que hoy en día son los

más estudiados y utilizados), consiste en la búsqueda de nuevos nanomateriales menos tóxicos (p.ej. con núcleo de ZnS) y que combinen las propiedades luminiscentes de los QDs con la posibilidad de realizar medidas de fosforescencia.

### A.1.3. Quantum dots fosforescentes

Trabajos recientes en el desarrollo de QDs ponen de manifiesto que el dopaje de estas nanopartículas con impurezas atómicas constituye una posible estrategia para manipular la emisión de los quantum dots<sup>8</sup>.

Así, entre las distintas impurezas que se pueden emplear en el dopaje, aparecen una gran variedad de metales como cobalto, cobre o terbio<sup>9,10</sup>. Sin embargo, los mejores resultados alcanzados hasta la fecha se consiguen empleando nanopartículas que incorporan en su estructura manganeso como agente dopante.

Variando el diseño del proceso de dopaje es posible encontrar diferentes situaciones de acuerdo a la naturaleza del estado excitado más bajo en energía del QD (nivel basal excitado). Estos diferentes escenarios determinarán sus propiedades fotofísicas y magneto-ópticas.<sup>11</sup>

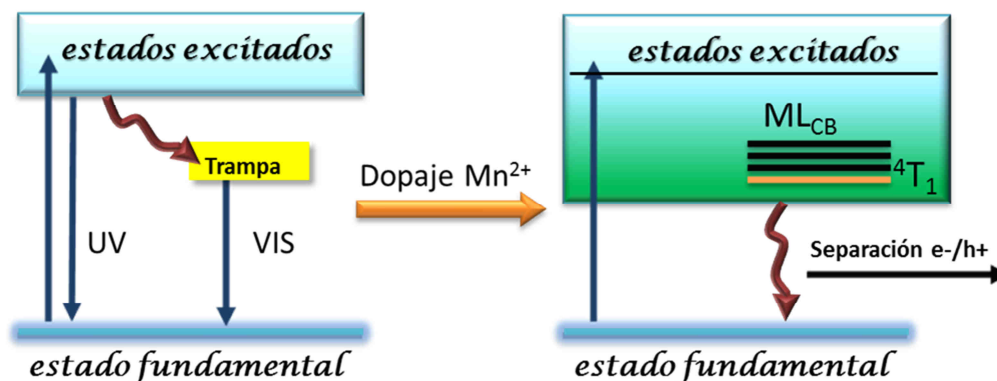
#### A.1.3.1. Escenario I: Los estados excitados del $Mn^{2+}$ debidos a procesos de fotoionización, son los más bajos en energía y se encuentran dentro del salto de banda del semiconductor.

En semiconductores que poseen un gran salto de banda es posible la introducción de mecanismos de relajación no radiativa que, en gran parte o totalmente, desactivan la emisión del nanocrystal debido a la existencia de estados fotoionizados de tipo donador o aceptor dentro del salto de banda.<sup>11,12</sup>

Para la mayoría de los semiconductores II-IV dopados con manganeso, todos los estados fotoionizados de tipo donador y aceptor se encuentran fuera del salto de banda, y no se detecta este fenómeno, a excepción de los QDs de ZnO dopados con  $Mn^{2+}$ . En disoluciones coloidales de quantum dots de ZnO dopados con  $Mn^{2+}$ , hay un tipo de sub-estado donador fotoionizado en el salto de banda (sub-bandgap donor-type photoionization state) que es el responsable de este proceso.

En este caso, se produce una desactivación de la luminiscencia debida a una transferencia de carga metal-ligando (banda de conducción -CB-) o  $Mn^{2+} \rightarrow Mn^{3+} + e^-_{CB}$ . Debido a que este estado fotoionizado es el estado excitado de menor energía, en gran parte,

es el que define las propiedades fotofísicas de los nanocristales de  $Mn^{2+}$ -ZnO. Además, tal y como puede verse en la figura 4, proporciona un camino muy eficiente para la relajación no radiacional al estado fundamental. A día de hoy, los detalles de esta relajación no radiativa no están totalmente claros, aunque se cree que puede estar relacionada con la relajación multifonónica.



**Figura 4. Efecto del  $Mn^{2+}$  en las propiedades fotofísicas de los nanocristales de  $ZnO^{11}$ .**

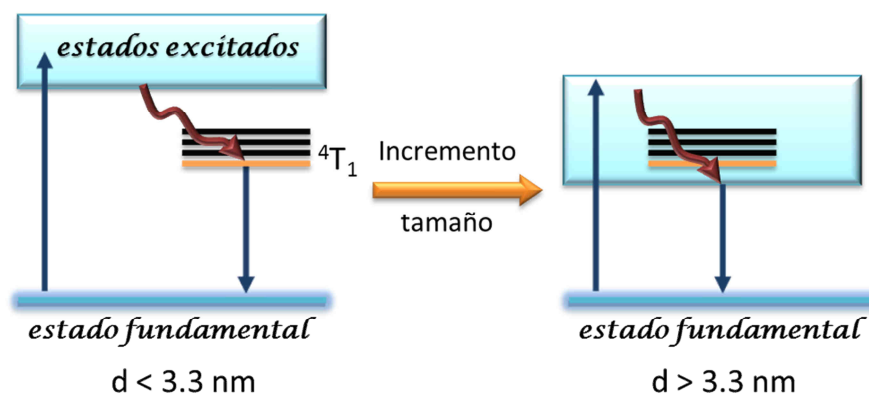
La luminiscencia UV y visible de los nanocristales de ZnO es atenuada y no se observa la emisión debida al  $Mn^{2+}$ , pero si la separación de carga fotoinducida con la fotoexcitación del sub-salto de banda<sup>11</sup>.

La aparición de un estado fotoionizado como estado excitado de menor energía dentro del salto de banda del semiconductor hace que la estructura electrónica y las propiedades fotofísicas de los nanocristales de  $Mn^{2+}$ -ZnO sean diferentes a las descritas en los demás escenarios.

#### **A.1.3.2. Escenario II: Los estados excitados del semiconductor son los más bajos en energía (estados excitados de $Mn^{2+}$ se encuentran fuera del salto de banda).**

Es bien conocido que el salto de banda del semiconductor depende del tamaño del QD. Así, en el caso de los  $Mn^{2+}$ -CdSe QDs, la emisión característica a través del  $Mn^{2+}$  se observa cuando la energía del salto de banda de la nanopartícula es mayor que la energía del estado excitado  $^4T_1$  del  $Mn^{2+}$  (tal y como se describirá posteriormente en el escenario III), pero sólo se observa la emisión debida a los excitones del QD cuando la energía del salto de banda es menor que la energía del  $^4T_1$  de la impureza. Sin embargo, la emisión excitónica predominante observada en los nanocristales pequeños de  $Mn^{2+}$ -CdSe es debida a los nanocristales sin dopar, esto tiene una mayor probabilidad de ocurrir ya que el diámetro del nanocristal es pequeño y el dopante está excluido del núcleo.

Que la emisión se deba al escenario II o a un escenario alternativo III (que se describirá a continuación) dependerá del diámetro de la nanopartícula. Los cambios se encuentran en torno a diámetros de 3.3 nm. Los quantum dots de  $Mn^{2+}$ -CdSe son los únicos que permiten cambiar de un escenario a otro simplemente modificando el diámetro del nanocrystal, como se puede observar en la figura 5.



**Figura 5. Diferentes emisiones que podemos encontrar en función del diámetro de la nanopartícula<sup>11</sup>.**

Aunque la emisión debida a la nanopartícula sólo la podemos observar en QDs de  $Mn^{2+}$ -CdSe de tamaño relativamente grande (mayor de 3.3 nm), las propiedades luminiscentes de éstos son alteradas por la presencia de iones  $Mn^{2+}$ . Específicamente, la emisión de quantum dots con diámetro superior a 3,3 nm se puede polarizar aplicando un campo magnético, incluso cuando los QDs se excitan con fotones incoherentes o no polarizados. La introducción de manganeso da lugar a un fuerte acoplamiento  $Mn^{2+}$ -portador de intercambio magnético, lo cual permite el sobrenombre de "giant excitonic Zeeman splitting".

**A.1.3.3. Escenario III: Los estados excitados del  $Mn^{2+}$  son los más bajos en energía y se encuentran dentro del salto de banda del semiconductor.**

Los nanocristales coloidales de este tipo son de gran interés para aplicaciones foto o electro-luminiscentes, ya que la excitación del semiconductor permite la transferencia de energía rápida al manganeso, lo cual se traduce en emisiones con altos rendimientos cuánticos<sup>12</sup>.

En la bibliografía se encuentran ejemplos en los que se lleva a cabo el dopaje con  $Mn^{2+}$  de quantum dots de diferente naturaleza con núcleos metálicos (por ej. ZnS, ZnSe y CdS).

El manganeso como agente dopante se utiliza en el estado de oxidación 2+, por lo que tiene una configuración electrónica  $d^5$ . Tanto para la geometría octaédrica como para la tetraédrica, el estado fundamental correspondiente es  ${}^6A_1$  y el primer estado excitado, en este entorno del metal, es  ${}^4T_1$ . Las transiciones desde el nivel fundamental  ${}^6A_1$  a todos los estados excitados se consideran transiciones prohibidas, ya que ninguno tiene igual multiplicidad de espín, y sólo se observa un débil acoplamiento spin-órbita, lo cual se traduce en que la transición  ${}^6A_1 \rightarrow {}^4T_1$  tiene un coeficiente de extinción molar entre  $\epsilon_{Mn^{2+}} \sim 10-10^1 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , muy inferior si lo comparamos con el  $\epsilon_{QD} \sim 10^5-10^6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  para el primer máximo de absorción de un quantum dot típico. Por ello al excitar con luz UV los QDs dopados, el semiconductor absorbe los fotones llegando a un estado excitado que se desactiva a través de los niveles energéticos del  $Mn^{2+}$ . El fenómeno luminescente sucede ya que existen pequeñas constantes de velocidad radiativa (pequeñas intensidades de emisión) para  ${}^4T_1 \rightarrow {}^6A_1$ , pero muy energéticas debido al salto de energía de esta transición, lo que permite la fotoluminiscencia  ${}^4T_1 \rightarrow {}^6A_1$  con altas eficiencias cuánticas. Esta es la transición más comúnmente descrita en los estudios de dopaje de nanocristales semiconductores con manganeso.

En la figura 6 se ilustra la transferencia de energía que se produce al irradiar con luz UV QDs dopados con  $Mn^{2+}$ . Tal y como muestra la figura 6, el gran salto energético entre el estado excitado  ${}^4T_1$  y el estado fundamental contribuye a altos rendimientos cuánticos fotoluminiscentes y tiempos de vida media muy largos (del orden de los milisegundos). Estos procesos, que se han observado experimentalmente, pueden atribuirse al confinamiento espacial del excitón en el mismo espacio que el dopante.

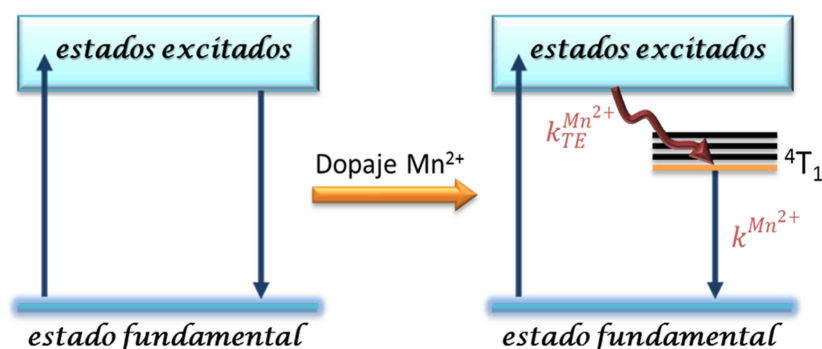


Figura 6. Esquema de la transferencia de energía que se produce en el QD cuando se introducen impurezas de  $Mn^{2+}$  en su estructura<sup>11</sup>.

En este escenario se consiguen unas nanopartículas luminiscentes cuya emisión tiene características típicas de la fosforescencia molecular. Es bien sabido que la emisión fosforescente ofrece importantes ventajas sobre la fluorescencia como son:

- Elevada sensibilidad debida a las bajas señales de fondo.
- Una excepcional selectividad ya que compuestos fosforescentes disponibles son muy escasos.
- Mayor separación entre las longitudes de onda de absorción y emisión debido a que el estado excitado triplete proporcionado por el manganeso es de menor energía, lo que produce máximos de emisión a mayores longitudes de onda.
- El fenómeno fosforescente posee un tiempo de vida media muy superior al de fluorescencia (del orden de milisegundos), lo que permite la posibilidad de discriminar temporalmente la emisión luminiscente y llevar a cabo medidas a tiempo resuelto (mucho más robustas que las medidas de intensidad). Además, debido a esto, es posible evitar los fenómenos de dispersión de la luz y variaciones en la fuente y muy importante, los fenómenos de autofluorescencia de distintos materiales o componentes biológicos de las muestras<sup>13</sup>.

La combinación de las propiedades de los QDs unidas a una emisión de características fosforescentes es muy apropiada para aplicaciones bioanalíticas. Debido a lo expuesto anteriormente, en este trabajo se sintetizarán y se estudiarán QDs fosforescentes que cumplen las condiciones de este último escenario (QDs de ZnS dopados con Mn<sup>2+</sup>).

### **A.1.4. Solubilización de quantum dots en medios acuosos**

Un aspecto fundamental que se debe tener en cuenta es que, en general, los QDs que sintetizan siguiendo las rutas convencionales son insolubles en medios acuosos, lo que constituye una gran limitación a su aplicación directa en el campo del análisis bioquímico o medioambiental, ya que en la mayoría de las aplicaciones la propia matriz de la muestra es acuosa. Por tanto, para poder emplear los QDs en este tipo de aplicaciones, ha de asegurarse la solubilización de los mismos en medios acuosos, lo cual generalmente se consigue mediante la modificación de la superficie de la nanopartícula con ligandos que impriman un carácter hidrofílico. Pero además, sería deseable que los ligandos seleccionados posean grupos funcionales (tipo carboxilo, amino, etc.) que hagan que dichas nanopartículas no solamente sean estables, biocompatibles y solubles en medios acuosos manteniendo sus

propiedades fotoluminiscentes originales sino que además permitan futuras bioconjugaciones a biomoléculas u otras especies químicas<sup>14</sup>.

Alternativamente existen unos pocos tipos de QDs para los que se han desarrollado vías sintéticas mediante las que se consiguen nanopartículas directamente solubles en agua<sup>15</sup>, introduciendo en el proceso de síntesis ligandos con grupos funcionales hidrofílicos. Incluso, recientemente se ha conseguido obtener CdTe QDs mediante la introducción de precursores salinos en la alimentación de lombrices de tierra, gracias a su capacidad de asimilación de metales pesados<sup>16</sup>.

Sin embargo, los procesos de síntesis generales más utilizados y en los que se consiguen QDs de mayor calidad, tienen lugar en medio orgánico empleando normalmente disolventes orgánicos no polares como trioctilfosfinas (TOP), óxido de trioctilfosfina (TOPO) y hexadecilamina (HPA)<sup>17</sup>. Esto se debe a que la mayoría de los precursores empleados en la síntesis (organometálicos, óxidos y metales) no son solubles en medios acuosos. Por ello, las nanopartículas que se obtienen finalmente por este tipo de procesos, únicamente son solubles en disolvente orgánicos no polares como tolueno o cloroformo. Por tanto, durante los últimos años, se han intentado diseñar tanto estrategias para conseguir directamente en el proceso de síntesis QDs solubles en disoluciones acuosas, como mecanismos de derivatización y modificación de la superficie de estos persiguiendo su solubilidad y estabilidad.

Pero, tal y como se ha mencionado anteriormente, además de conseguir QDs compatibles con medios acuosos existen otras razones por las que el diseño de recubrimientos está siendo objeto de estudio en los últimos años, derivadas del gran potencial que tienen estas nanopartículas para diferentes aplicaciones. En este sentido, se persigue la funcionalización de los QDs con biomoléculas (anticuerpos, DNA, aptámeros, enzimas, etc.) con capacidad de reconocimiento para ser utilizados, tanto en aplicaciones bioanalíticas como en biomedicina terapéutica y diagnóstico mediante técnicas de imagen<sup>18,19</sup>. Así, mediante la modificación de la superficie, se pretende obtener QDs biocompatibles, con una estabilidad coloidal muy elevada en medios biológicos y además, con grupos funcionales en su superficie que permitan la bioconjugación de los mismos a biomoléculas con capacidad de reconocimiento.

### **A.1.4.1. Estrategias de solubilización y modificación superficial**

Las principales estrategias desarrolladas para transferir las nanopartículas a medio acuoso son:



### **i. Interacción hidrofóbica con polímeros anfifílicos**

Esta estrategia consiste en intercalar una serie de cadenas hidrofóbicas de un polímero anfifílico, mediante la interacción con cadenas carbonadas que rodean a la nanopartícula formando parte de los recubrimientos que se utilizan como agentes coordinantes en las síntesis en medio orgánico<sup>20,21</sup>. El polímero anfifílico tiene en su extremo grupos funciones (grupos carboxilo, amino o segmentos de PEG que constituyen la parte hidrofílica del polímero) orientados hacia el exterior para que se adquiera la solubilidad en medios acuosos.

Los polímeros anfifílicos utilizados poseen numerosas cadenas hidrofóbicas, por lo que la unión con el QD está favorecida por los numerosos puntos de contacto entre las cadenas. Debido a esto, los QDs obtenidos por esta estrategia poseen generalmente un mayor rendimiento cuántico de fluorescencia, y son frecuentemente más estables que aquellos en los que se utilizan otros métodos. A pesar de todas las ventajas que proporciona este método, la longitud de los polímeros utilizados hace que el radio hidrodinámico de la nanopartícula se vea muy incrementado, siendo esto no deseable para algunas aplicaciones.

### **ii. Silanización**

Consiste, como su nombre indica, en la formación de una capa de sílice alrededor de la superficie del nanocrystal empleando precursores con grupos funcionales, para permitir su unión a las nanopartículas, como son el mercaptopropiltris(metiloxi)silano (MPS) o el aminopropil(trimetiloxi)silano (APS)<sup>22</sup>. En este caso se produce una sustitución de los ligandos hidrofóbicos de la superficie del nanocrystal.

Por este método se consigue obtener un recubrimiento compacto que proporciona fotoestabilidad y evita procesos de desorción. Sin embargo, resulta bastante tedioso y es difícil de controlar, con lo frecuentemente no se obtienen recubrimientos homogéneos y aparecen problemas de agregación<sup>23</sup>. Además esta capa de sílice que se deposita debe ser modificada mediante reacciones posteriores para permitir la unión a biomoléculas.

### **iii. Intercambio de ligandos**

En esta estrategia las moléculas que rodean a los QDs son reemplazadas por moléculas bifuncionales que generalmente contienen grupos tioles (-SH) en uno de los extremos, ya que tienen alta afinidad por metales de los que suelen componer los QDs como son Zn, Cd o Pb. Además estos ligandos suelen tener un grupo funcional polar en el otro extremo encargado de permitir la solubilidad en medios polares<sup>24</sup>.

Esta ruta de modificación es muy sencilla y puede ser utilizada para una gran variedad de ligandos con grupos funcionales que permitan la posterior bioconjugación de los QDs. Esta estrategia también puede presentar algunas desventajas, ya que puede proporcionar dispersiones coloidales con una baja estabilidad debida a la desorción de los ligandos<sup>25</sup>. Este problema puede minimizarse utilizando determinados recubrimientos con suficiente afinidad y varios puntos de anclaje a la nanopartícula, originando así QDs solubles con alta estabilidad a largo plazo.

### **A.1.4.2. Tipos de ligandos empleados en la solubilización de QDs**

Un ligando hidrofílico ideal debe tener las siguientes características<sup>26</sup>:

- Proveer a los QDs de solubilidad y estabilidad coloidal en medio biológicos acuosos
- Hacer que se mantengan las propiedades fotofísicas nativas de los QDs en medios acuosos, así como protegerlos del photobleaching.
- Tener grupos funcionales que puedan ser conjugados a biomoléculas.
- Deben minimizar el radio hidrodinámico total.

Como se ha descrito en el apartado anterior, una de las estrategias más simples y empleadas con mayor frecuencia en la solubilización de QDs es la modificación de su superficie mediante un procedimiento de intercambio de ligandos. En el caso de recurrir a esta estrategia o en el caso de la síntesis para obtener QDs directamente solubles en medios acuosos, los primeros estudios recurrían al empleo de recubrimientos de moléculas pequeñas (mercaptoetanol, ácido mercaptoacético, cisteamina, etc). Sin embargo, este tipo de moléculas no consiguen estabilizar las nanopartículas en medios de fuerza iónica elevada y se ven afectados por cambios en el pH de la disolución, lo que conlleva finalmente a la agregación y precipitación. Además, este tipo de moléculas presentan limitaciones a la hora de trabajar en medios ricos en proteínas, ya que presentan problemas de adsorciones inespecíficas a estas. Alternativamente, los recubrimientos poliméricos pueden minimizar estas adsorciones. Sin embargo, este tipo de recubrimientos aumentan el radio hidrodinámico efectivo de los QDs. Cuando se introducen estas nanopartículas con un radio hidrodinámico elevado en medios celulares pueden ser reconocidas y eliminadas por endocitosis u otros mecanismos, no llegando a cumplir su función. En metodologías fotoluminiscentes dependientes de la distancia, como son las que utilizan mecanismos de transferencia de energía (FRET) es complicado utilizar polímeros o ligandos de gran longitud.

Afortunadamente gracias a la cantidad de estudios realizados sobre la solubilización de nanopartículas, existen numerosos tipos de ligandos alternativos disponibles que pueden ser empleados para estabilizar los QDs sin sufrir este tipo de problemas. En el caso de los QDs, como ya se ha mencionado anteriormente, se han venido utilizando con profusión ligandos tiolados debido a la alta afinidad de este grupo funcional por los metales que componen los núcleos, aunque se pueden utilizar otras estrategias de anclaje del ligando. En función del número de grupos tiol presentes en los ligandos, se pueden encontrar del tipo monodentado y bidentado. Además se han desarrollado algunas estrategias mediante el uso de ligandos multidentados con otros grupos funcionales.

### **i. Ligandos tiolados monodentados**

Los comienzos de la modificación de QDs con ligandos monotiolados se llevan a cabo en el grupo de Nie, desarrollando un protocolo para conseguir CdSe/ZnS QDs recubiertos con ácido mercaptoacético. A partir de este punto han sido utilizados otros muchos monotioles como el ácido mercaptopropiónico (MPA)<sup>27</sup>, cisteamina<sup>28</sup>, cisteína<sup>29</sup> o azúcares derivatizados con tioles<sup>30</sup>.

La gran popularidad y el uso extendido de este tipo de ligandos, nace de la facilidad con la que se pueden utilizar y manejar, su precio y disponibilidad comercial.

Pero debido a que la interacción metal-tiol es dinámica, los QDs con este tipo de recubrimientos tienden a precipitar a medio plazo. El pH juega un papel muy importante ya que en medios ligeramente ácidos los grupos se encuentran protonados y pueden desorberse de los nanocristales. Como consecuencia de la pérdida de densidad en el recubrimiento, la superficie de los QDs puede quedar expuesta a fenómenos de oxidación, disminuyendo el rendimiento cuántico.

### **ii. Ligandos tiolados bidentados**

Para conseguir solucionar los problemas de estabilidad de los recubrimientos monotiolados, Mattousi y col.<sup>31</sup> propusieron el uso del ácido dihidrolipoico (DHLLA), un ditiol carboxilado, para estabilizar CdSe/ZnS QDs. Tras un proceso de intercambio de ligandos, estos autores encontraron que las nanopartículas obtenidas eran estables en un amplio intervalo de pH y la estabilidad coloidal de las nanopartículas se mantenía durante largos periodos de tiempo (desde al menos seis meses hasta más de dos años). Sin embargo, debido a los impedimentos estéricos, la baja densidad de ligandos en la superficie del nanocristal provocaba en ocasiones la pérdida de la luminiscencia nativa de los QDs.

Otras ventajas de utilizar este ligando es que permite su modificación con compuestos con base de polietilenglicol (PEG) con diferentes grupos funcionales<sup>32,33</sup>. Los recubrimientos con base PEG proporcionan a las nanopartículas una biocompatibilidad muy elevada, lo que para aplicaciones *in vitro* e *in vivo* es esencial. Además este tipo de ligandos compuestos por DHLA-PEG se sintetizan ya a la carta (longitud y grupos funcionales), pudiendo utilizarse en numerosas aplicaciones.

### **iii. Ligandos multidentados**

Los ligandos multidentados ofrecen una alta estabilidad debido a la presencia de varios puntos de anclaje de los ligandos a superficie de los QDs. Entre estos nuevos ligandos se encuentran las fosfinas oligoméricas (OPs)<sup>34</sup>, que se consiguen a través de las alquifosfinas utilizadas para estabilizar los QDs hidrofóbicos y un agente entrecruzante como el diisocianato de hexano para formar un ligando polidentado. Los estudios realizados hasta el momento demuestran que se consigue mantener el rendimiento cuántico de los QDs nativos, así como la estabilidad en un amplio intervalo de pHs (5.5-12) y en medios de elevada fuerza iónica.

Otro ejemplo de este tipo de recubrimientos que se puede encontrar en la bibliografía son los copolímeros en bloque como el PEG-b-PDMA<sup>35</sup>.

Problemas derivados de una reducida disponibilidad, del alto costo de estos ligandos y la necesidad de llevar a cabo procesos de purificación complejos (cuando estos son sintetizados en el laboratorio) limitan el uso actual de estas alternativas.

## **A.2. APLICACIONES BIOANALÍTICAS DE LOS QDS: DESARROLLO DE INMUNOENSAYOS**

Debido a las propiedades únicas que presentan los QDs éstos aparecen hoy en día como prometedores marcadores ópticos, dando lugar tanto a estudios fundamentales como a su empleo con un amplio rango de aplicaciones en los más diversos campos como, por ejemplo, sensores químicos, catalizadores, bioanálisis, nanomedicina y electrónica. Además, la conjugación de QDs a moléculas de reconocimiento específicas, como anticuerpos o aptámeros, es el paso de partida para la determinación selectiva de proteínas y/o ácidos nucleicos a través de bioensayos (p.ej. inmunoensayos).

En efecto, las excepcionales características optoelectrónicas de estos nanomateriales junto con la posibilidad de solubilizarlos y/o funcionalizarlos, hacen que estén emergiendo

como una poderosa “herramienta de visualización” (marcadores luminiscentes) reemplazando el uso de fluoróforos orgánicos convencionales y marcadores radiactivos utilizados hasta el momento, ya que solventan muchos de los problemas y limitaciones que presentaban este tipo de marcas en aplicaciones bioanalíticas.

### **A.2.1. Generalidades de los inmunoensayos**

Los métodos inmunoquímicos de análisis están basados en la detección de la reacción o interacción reversible altamente selectiva entre un anticuerpo (Ab) y su antígeno (Ag). Actualmente, este tipo de técnicas no sólo se utilizan en el análisis de rutina en el campo de la química clínica, también tienen gran aplicación para la determinación de contaminantes orgánicos en el medio ambiente y control alimentario. El uso tan extendido de estas técnicas deriva de su gran selectividad y otras ventajas como son el análisis directo de muestras empleando un pequeño volumen, un tiempo de análisis relativamente corto, capacidad de alta frecuencia de muestreo y bajo coste.

Los inmunoensayos pueden clasificarse teniendo en cuenta distintos criterios, así podemos encontrar en primer lugar **inmunoensayos directos** (medida directa del complejo Ag-Ab) e **inmunoensayos con reactivos marcados o indirectos** (requieren el uso de material marcado con un trazador para medir la concentración de antígeno o anticuerpo presente en la muestra).

Los inmunoensayos indirectos son los que permiten el análisis de muestras complejas alcanzando menores límites de detección, por lo que son los que se tratan en este trabajo.

Dentro de los inmunoensayos con marcadores se pueden realizar distintas clasificaciones según atendamos a:

- (i) Tipo de marca que se emplea para la detección: radioinmunoensayos, inmunoensayos enzimáticos, inmunoensayos fotoluminiscentes.
- (ii) Si es necesaria una etapa de separación para distinguir entre la especie marcada libre y el complejo anticuerpo-antígeno marcado estaremos ante ensayos de tipo heterogéneo, sino se denominan inmunoensayos homogéneos
- (iii) El formato de ensayo puede ser competitivo (concentración de analito inversamente proporcional a la señal) o no competitivo (la curva concentración-respuesta es creciente).

### **A.2.2. Empleo de los QDs en el desarrollo de fluoroinmunoensayos**

De entre las técnicas de detección utilizadas típicamente en el desarrollo de inmunoensayos, la estrategia basada en el uso de marcas luminiscentes es una de las más empleadas debido a su elevada sensibilidad, selectividad y su potencial para ser empleada en medidas *in situ*, en la propia muestra, sin necesidad de realizar una separación previa<sup>36</sup>.

Como se ha mencionado anteriormente, recientemente, los químicos analíticos han comenzado a explorar el empleo de los QDs para el desarrollo de inmunosensores e inmunoensayos de nueva generación para aplicaciones bioquímicas. La capacidad de los conjugados QD-anticuerpo de mantener la funcionalidad de la unidad biológica a la que se une el nanomaterial abrió las puertas a su aplicación en el campo del bioanálisis y más concretamente en las técnicas inmunológicas. La primera aplicación basada en una reacción inmunológica de aglutinación fue llevada a cabo por Chan y Nie<sup>24</sup>. En ella, QDs de CdSe/ZnS eran covalentemente unidos a inmunoglobulinas tipo G humana y posteriormente se incubaban con anticuerpos policlonales específicos y BSA. El resultado observado fue que la presencia de una concentración de anticuerpo determinada daba lugar a la aglutinación de los QDs, visible a través de un microscopio invertido. Más tarde se desarrollaron ensayos tipo sándwich para la determinación de diversos analitos como por ejemplo el realizado por Goldman y col. para el análisis de Enterotoxina<sup>37</sup>. También, gracias a las especiales características optoelectrónicas de este tipo de marcadores luminiscentes, se ha descrito su uso en metodologías de transferencia de energía FRET<sup>38</sup> (Förster Resonance Energy Transfer) en las que actúan como excepcionales donadores de energía, expandiendo así el campo de aplicaciones inmunológicas de los QDs. Esta aplicación reside en la posibilidad de modular la longitud de onda de emisión de los QDs en función de su tamaño y composición. En este tipo de metodología se necesita la solapación espectral de una molécula aceptora con una donadora de energía. Encontrar compuestos con espectros que se solapen es complicado y limitaba esta estrategia, pero con los QDs es posible obtener excelentes donadores con la longitud de onda de emisión deseada para cada caso fácilmente<sup>39</sup>. En la bibliografía se pueden encontrar varios ejemplos en los que se utilizan QDs como marcas en distintos tipos de formatos de ensayos, ya sean sándwich o competitivos<sup>40</sup>.

Una de las aplicaciones más interesantes en este campo fue desarrollada por el grupo de Mattoussi<sup>41</sup> llevando a cabo un ensayo multianalito basado en la capacidad de modular la emisión de los QDs en función de su tamaño (distintas longitudes de onda de emisión). En este estudio consiguieron detectar cuatro toxinas simultáneamente mediante un ensayo

ELISA tipo sándwich, marcando cada anticuerpo con un QD de distinto tamaño y llevando a cabo su detección mediante la excitación simultánea de los QDs con una única fuente a una longitud de onda dada.

### **A.2.3. Inmunoensayos con nanomateriales como marcadores: amplificación de la señal**

En los últimos años la búsqueda de biomarcadores es una de las principales líneas de investigación en múltiples campos: bioquímica, medicina, genética y genómica, neurofisiología, etc. Un biomarcador (también llamado marcador biológico) es una sustancia que ayuda a medir un proceso biológico normal o debido una enfermedad así como la respuesta a un tratamiento. Los esfuerzos dedicados a este campo se deben a que, por un lado los biomarcadores ayudan a la detección temprana de enfermedades y a su seguimiento durante y tras el tratamiento de estas y además, contribuyen a desarrollar terapias más seguras, efectivas y de una manera más económica, permitiendo a la larga una mejora de la eficiencia en el sistema de salud<sup>42</sup>.

En efecto, estos biomarcadores se encuentran, en la mayoría de los casos, en niveles muy bajos de concentración en fluidos biológicos y tejidos, por lo que en el campo del bioanálisis se intentan desarrollar metodologías que consigan alcanzar niveles de detección muy bajos tanto para la implantación de métodos de análisis de biomarcadores de forma fiable y simple como para el descubrimiento y validación de estas sustancias indicadoras.

En este contexto, hoy en día, se presta una especial atención al desarrollo de técnicas inmunológicas para la detección de estos analitos debido a que estas técnicas cumplen con los requisitos de alta sensibilidad y especificidad. En efecto, la posibilidad de desarrollar inmunoensayos basados en el empleo de nanomateriales fluorescentes como marcadores es una de las líneas de investigación de estas nanopartículas de mayor interés actual en el ámbito biomédico.

En este sentido, estrategias basadas en la interacción antígeno-anticuerpo utilizando el marcaje con nanopartículas de oro consiguen alcanzar límites de detección extremadamente bajos<sup>43</sup>. Estos métodos altamente sensibles se basan en la conocida capacidad que tienen las nanopartículas de oro para la deposición catalítica de oro o plata<sup>44,45</sup>. En la bibliografía existen varios ejemplos del empleo de "inmunooro" con amplificación metálica para el desarrollo de ensayos con diferentes métodos de detección como microgravimetría<sup>46</sup>, electroquímicos<sup>47,48</sup> o por espectrometría de masas con fuente de plasma

de acoplamiento inductivo (ICPMS)<sup>49</sup>. Esta última es especialmente atractiva debido a las grandes ventajas que posee esta técnica como son su extremada sensibilidad para la detección de metales, los bajos efectos de matriz<sup>50</sup>, rangos de trabajo amplios y simultánea detección multielemental e isotópica, por lo que tiene elevado potencial para el análisis multianalito.

La extremada capacidad del ICPMS y su aplicación en el campo de los nanomateriales no sólo se limita a ser empleado como simple sistema de detección, además también está demostrando ser una potente herramienta para la caracterización de nanopartículas<sup>51</sup>, imprescindible para su uso de estas en las aplicaciones que se quieran desarrollar. Esta técnica también ha conseguido mejorar los límites de detección alcanzados por la fluorescencia en inmunoensayos basados en el empleo de CdSe/ZnS QDs como marcas<sup>52</sup>, debido a la amplificación elemental que proporcionan estas nanopartículas formadas por cientos de átomos. En este sentido, el empleo de QDs en inmunoensayos permitía con el mismo sistema la detección de compuestos de interés en primer lugar mediante técnicas luminiscentes y si fueran necesarios mejores límites de detección utilizar ICPMS.

Por otro lado, es de esperar que debido a la elevada relación área/volumen los QDs tengan actividad catalítica, existen algunos estudios donde se refleja la actividad fotocatalítica de los QDs<sup>53</sup> pero para la deposición de metales su capacidad está aún por explorar. Si esto pudiese llevarse a cabo sería posible la detección fotoluminiscente y posterior medida por ICPMS con amplificación elemental debida a los QDs o mediante amplificación metálica, en ambos casos para obtener mayor sensibilidad.

### **A.3. ANTÍGENO PROSTÁTICO ESPECÍFICO**

El antígeno prostático específico (frecuentemente abreviado por sus siglas en inglés "PSA") es una glicoproteína de 33 kDa sintetizada por células de la glándula prostática. Su medida en suero constituye un valioso biomarcador para el diagnóstico, pronóstico y seguimiento del cáncer - tanto localizado como metastásico- y otros trastornos de la próstata, como la prostatitis<sup>54</sup>. En efecto, los niveles normales en sangre de PSA en los varones sanos son muy bajos y se elevan en la enfermedad prostática.

Esta proteína puede encontrarse en el suero libre o complejada de diferentes formas, pero actualmente en las pruebas clínicas se utiliza la medida de PSA total (tPSA), que engloba todas las formas. Aunque los niveles pueden variar de un individuo a otro debido a diferentes



razones, concentraciones de tPSA en suero por encima de 4 ng/mL indican una alta probabilidad de padecer un proceso tumoral de este tipo<sup>55</sup>.

Los niveles de tPSA no sólo se utilizan para el diagnóstico de la enfermedad, también se usan como indicador de la respuesta al tratamiento con terapias adyuvantes (quimioterapia, radioterapia, terapia con hormonas, terapia dirigida, terapia biológica, etc.) y recurrencia tras una prostatectomía radical, intervención donde se extirpa la glándula prostática y algunos tejidos que se encuentran alrededor de ésta, con el fin de eliminar los tumores. En este caso se eliminan en gran parte las fuentes de producción de PSA, por lo que los niveles disminuyen hasta los pocos pg/mL<sup>56</sup>.

Los inmunoensayos comercialmente disponibles con menores límites de detección pueden llegar a detectar 0.1 ng de PSA por mL de suero. Estos límites son adecuados para el diagnóstico del cáncer de próstata pero no son suficientemente bajos para el control tras los tratamientos.

Por otro lado, en los últimos años se ha descubierto que en diversos tejidos y órganos como ovarios y mamas, también es posible la producción de PSA, llegando a encontrarse concentraciones muy bajas de esta proteína en el suero de mujeres<sup>57</sup>. Recientes estudios parecen indicar que niveles anormalmente elevados de PSA (por encima de 1 pg/mL) en el suero de mujeres podrían estar relacionados con el cáncer de mama. Las mamografías son el primer método de control de este cáncer y aunque con esta prueba se detecta un elevado número de casos, tiene una tasa de falsos negativos del 31%<sup>58</sup>. Se conocen otros biomarcadores del cáncer de mama como son el antígeno carcinoembrionario (CEA) y otros antígenos como CA15-3 y CA27-29 pero se encuentran en niveles elevados en menos de un 50% de los pacientes con metástasis y no son suficientemente específicos para el diagnóstico precoz o el control de la recurrencia del cáncer de mama<sup>59</sup>. Debido a ello, los investigadores están intentando relacionar los niveles de PSA con el cáncer de mama para intentar utilizar esta proteína como biomarcador específico para el diagnóstico y control del cáncer de mama, pero este propósito es complicado debido a los niveles tan bajos de esta proteína que se pueden encontrar en el suero de las mujeres.

## ***B. OBJETIVO***

En la Introducción de este trabajo de investigación se ha puesto de manifiesto el elevado potencial que ofrecen los “quantum dots” (QDs) como alternativa a los luminóforos convencionales en el desarrollo de metodologías fotoluminiscentes de bioanálisis. En este sentido, existe actualmente una importante actividad investigadora orientada hacia la síntesis de nanopartículas luminiscentes coloidales con elevada estabilidad, de reducida toxicidad biocompatibles y que además, presenten novedosas propiedades luminiscentes. Particularmente, recientemente se ha estudiado la posibilidad de dopar nanopartículas semiconductoras con impurezas metálicas, obteniendo quantum dots con una emisión luminiscente con propiedades similares a la fosforescencia.

Por otro lado, en la bibliografía se pueden encontrar diversos ejemplos del uso de QDs fluorescentes como marcas para el desarrollo de metodologías inmunoquímicas de análisis para la determinación de distintas biomoléculas en muestras biológicas. Sin embargo, el empleo de QDs fosforescentes con estos fines es prácticamente inexistente, a pesar de las grandes ventajas que supone la detección por medidas de fosforescencia en muestras biológicas, como ya se comentó en apartados anteriores de la introducción.

Por todo ello, el objetivo planteado en este proyecto consistió en llevar a cabo la **síntesis, caracterización y funcionalización de nanopartículas metálicas fosforescentes para su empleo como nuevas “marcas” en inmunoensayos determinando PSA como analito modelo**. Además, debido a la necesidad de mejorar los límites de detección de las técnicas actuales para la determinación de esta proteína tras procesos quirúrgicos o para relacionarla con el cáncer de mama, **se intentó explorar la capacidad de los QDs fosforescentes para desarrollar metodologías de amplificación**.

Metodológicamente, este objetivo general ha sido abordado a través de los siguientes objetivos parciales:

1. Diseño y puesta en práctica del proceso de síntesis de quantum dots de ZnS dopados con  $Mn^{2+}$  directamente solubles en medios acuosos.
2. Modificación del recubrimiento superficial de los QDs mediante un proceso de intercambio de ligandos utilizando un recubrimiento bidentado para mejorar sus características fotoluminiscentes, así como eliminar los problemas relacionados con adsorciones inespecíficas.

3. Caracterización de las nanopartículas sintetizadas analizando la forma y tamaño, su emisión luminiscente y las distintas variables químicas e instrumentales que podrían afectar a su luminiscencia.
4. Desarrollo una metodología para bioconjugación anticuerpos a estas nanopartículas y posterior diseño de un inmunoensayo genérico. Se persigue, de este modo, diseñar una estrategia genérica de marcaje de anticuerpos con este tipo de nanopartículas para poder ser aplicada en el desarrollo futuro de técnicas inmunoquímicas fotoluminiscentes de análisis para cualquier proteína.
5. Evaluación del potencial de los QDs fosforescentes para metodologías de amplificación elemental en inmunoensayos con detección por ICP-MS.
6. Evaluación de la actividad catalítica de los QDs fosforescentes para la amplificación metálica con el fin de desarrollar en el futuro inmunoensayos altamente sensibles.

## ***C. EXPERIMENTAL***

## **C.1. INSTRUMENTACIÓN Y REACTIVOS**

En esta sección se describe la instrumentación y reactivos de carácter general utilizados para el desarrollo del trabajo de investigación.

### **C.1.1. Instrumentación empleada**

- Espectrofotómetro de luminiscencia Varian Cary Eclipse (Varian Ibérica) equipado con lámpara de Xenón (potencia de pico equivalente a 75KW), monocromadores Czerny-Turner y detector mediante tubo fotomultiplicador modelo R-298 y lector de microplacas ELISA.
- Espectrofotómetro UV/Vis/NIR modelo Lambda 900 Perkin Elmer.
- Microscopio electrónico de transmisión de alta resolución (HRTEM) modelo MET JEOL-JEM 2100F.
- Microscopio electrónico de transmisión (TEM) modelo MET JEOL-2000 EX-II.
- Equipo de medidas de Dinamic Ligth Scattering (DLS) Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments Ltd, Reino Unido).
- Sistema de separación Asymetrical Flow Field Flow Fractionation AF2000 MT Postnova Analytics (Alemania)
- Espectrómetro de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) modelo Agilent 7700 series (Japón).
- pHmetro modelo micro pH2000 (Crison)
- Balanza Precisa 180A, con precisión hasta  $\pm 0,01$ mg.
- Equipo de agua Milli-Q Advantage, Millipore.
- Rotavapor Heidolph WB2000/VV2000.
- Centrífuga Biofuge Stratus, Heraeus.

### **C.1.2. Material**

- Celda de cuarzo convencional para medidas de luminiscencia, Hellma (modelo 101-QS con paso óptico de 10 mm).
- Celda de cuarzo para medidas de luminiscencia, Hellma (50  $\mu$ L con paso óptico de 10 mm).
- 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).
- Micropipetas Labmate y Finnipipette de volúmenes variables y ajustables.
- Lámpara UV con longitud de onda de emisión de 365 nm 6 W (Vilber Lourmat).

- Filtros de ultrafiltración Amicon Ultra de 10 y 100 kDa de tamaño de poro de membrana (Millipore).
- Tubos Eppendorf con volúmenes de 0.5 y 1.5 mL.
- Línea de vacío.
- Material volumétrico de vidrio de calidad contrastada.
- Placas ELISA Lumitrac 600 96-well plates

### **C.1.3. Reactivos y disoluciones**

Todos los reactivos utilizados fueron de grado “pureza analítica” y no se ha realizado ningún tipo de purificación previa a no ser que se indique lo contrario. Las disoluciones acuosas han sido preparadas disolviendo la cantidad adecuada de reactivo sólido y utilizando agua ultrapura desionizada obtenida en un sistema Milli-Q System.

*Reactivos para la síntesis de QDs:*

- Sulfuro de sodio nonahidratado (Sigma-Aldrich).
- Cloruro de zinc heptahidratado (Merk).
- Ácido 3- mercaptopropiónico (Merk).
- Cloruro de manganeso tetrahidratado (Merk).
- Ácido clorhídrico (Merk).
- NaOH (Sigma-Aldrich).
- Etanol (Prolabo).

*Reactivos para la modificación del recubrimiento:*

- Ácido  $\alpha$ -lipoico (Sigma-Aldrich).
- Borohidruro de sodio (Sigma-Aldrich).
- Ácido acético glacial (Merk).
- Tolueno (Merk).
- Sulfato de sodio (Sigma-Aldrich).
- Metanol (Prolabo).
- Terbutóxido de potasio (Sigma-Aldrich).

*Reactivos y disoluciones para la caracterización y demás estudios:*

- Disoluciones reguladoras: buffer de borato de sodio (SBB) 50mM pH 12, bicarbonato de sodio 0.1 M pH 10 , buffer carbonato/bicarbonato de sodio pH 9 y pH 8, buffer de fosfatos (PBS) 10mM pH 7.4, buffer MES (ácido 2-(N-Morfolino) etanosulfónico de pH 5.5 y 6.5
- Yoduro de potasio (Merk).

- Bromuro de sodio (Merk).
- Sulfito de sodio (Merk).
- Acetato de amonio (Sigma-Aldrich).
- Cloruro de N-Etil-N'-(3-dimetillaminopropil)carbodiimida (Fluka)
- N-hidroxisuccidimina (Sigma-Aldrich)
- Detergente Tween20 (Sigma- Aldrich).
- Anticuerpo monoclonal de rata contra IgG+IgM de conejo (Acris).AM08099PU-N
- IgG conejo (Servicio Biotecnología y cultivos celulares, Servicios Científico-Técnicos UNIOVI).
- Anti-rata marcado con HRP (Sigma-Aldrich ) A9037
- Kit revelado ELISA espectrofotométrico TMB kit (Fisher).
- Anticuerpo anti-PSA (Abcam ab19554)
- Anticuerpo anti-PSA (Abcam ab10186)
- Antígeno específico prostático humano (Abcam ab78528)
- Anticuerpo secundario anti-ratón IgG (Abcam ab9163)

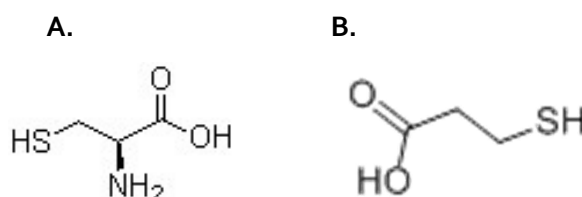
## **C.2. PROCEDIMIENTO DE SÍNTESIS DE QUANTUM DOTS FOSFORESCENTES**

En la bibliografía se han propuesto diferentes rutas para llevar a cabo la síntesis de quantum dots de núcleo ZnS y solubles en medio acuoso. En este trabajo, se ha realizado la síntesis de quantum dots de núcleo de ZnS dopados con manganeso, para obtener nanopartículas con propiedades luminiscentes similares a la fosforescencia. Este proceso de dopaje eleva el grado de complejidad de la síntesis, ya que estas nanopartículas dopadas deben ser solubles en medio acuoso para garantizar sus aplicaciones analíticas. Estudios previos realizados en el grupo de investigación en el que se ha realizado este trabajo, iniciaron la síntesis de QDs de ZnS dopados con Mn y estabilizados con un recubrimiento superficial de L-cisteína<sup>60</sup> siguiendo una ruta basada en un trabajo de Y. He y colaboradores<sup>61,62</sup>.

Ya que el objetivo general de este trabajo es desarrollar QDs con capacidad de ser funcionalizados con biomoléculas para su posterior utilización en el desarrollo de metodologías fotoluminiscentes de análisis, tras una serie de ensayos llevados a cabo en el laboratorio, se decidió no utilizar el recubrimiento de L-cisteína para tal fin. Esta decisión se tomó en base a que se encontró experimentalmente que al emplear un recubrimiento de L-cisteína, la presencia de dos grupos funcionales (carboxilo y amino) susceptibles ambos de bioconjugación (fig. 7A), posibilita la obtención de uniones biomolécula-QDs de diferente



naturaleza, obteniéndose una bioconjugación heterogénea difícil de controlar. Por tanto, se decidió iniciar la síntesis de ZnS QDs dopados con  $Mn^{2+}$  empleando un recubrimiento funcionalizado con un grupo tiol, para su anclaje a la nanopartícula, y con un único grupo carboxilo que confiere solubilidad en agua a los QDs, es susceptible de bioconjugación y permite garantizar un proceso de bioconjugación posterior mucho más homogéneo. La especie seleccionada bajo estas condiciones fue el ácido 3-mercaptopropiónico (MPA), esquematizado en la figura 7B. Se ensayaron además otros recubrimientos pero este proporcionó unas nanopartículas altamente luminiscentes, directamente solubles en medio acuoso mediante un proceso de síntesis simple y reproducible.



**Figura 7: recubrimientos A) L-cisteína B) ácido 3-mercaptopropiónico**

La síntesis de las nanopartículas de  $Mn^{2+}$ :ZnS se llevó a cabo en nuestro laboratorio, en varias etapas que se describen a continuación y aparecen esquematizadas en la figura 8:

En primer lugar se preparan disoluciones acuosas de los reactivos necesarios para la síntesis. Se mezclan en un vaso de precipitados, 5.00 mL de  $ZnCl_2$  0.1M, 0.15 mL de  $MnCl_2$  0.1M (10% HCl), 0.17 mL de ácido 3-mercaptopropiónico y 44.68 mL de agua Milli Q.

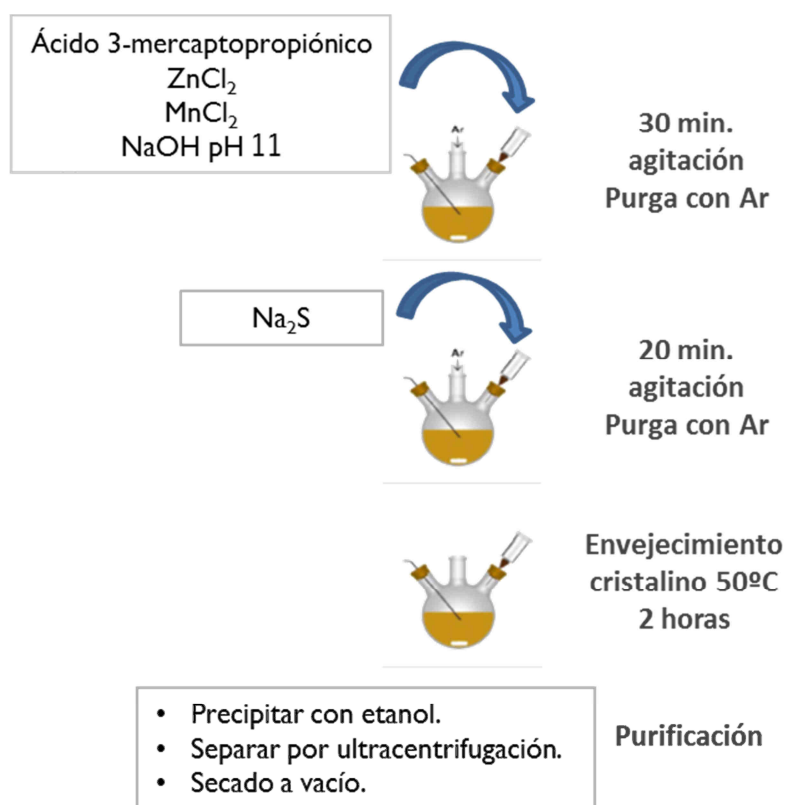
A continuación, se lleva la mezcla a pH 11 con NaOH 1M y se vierte el contenido en un matraz de tres bocas, colocado en una manta calefactora equipada con un termopar y un controlador de temperatura.

La mezcla se desoxigena durante 30 min bajo agitación constante y atmósfera de argón, tras este tiempo se inyectan rápidamente 5 mL de  $Na_2S$  0.1M, manteniendo la agitación y el flujo de argón durante 20 min.

A continuación, se eleva la temperatura de la disolución a 50°C, al aire y bajo agitación continua durante dos horas, para someter a las nanopartículas a un proceso de envejecimiento, con el que se consigue incrementar su cristalinidad<sup>64</sup>.

Tras el proceso de síntesis es necesaria una etapa de purificación en la que se elimina el exceso de reactivos. Se lleva a cabo mediante sucesivos lavados y procesos de ultracentrifugación a 5000 rpm en etanol (2x 15 min y 2x 5 min), descartando el sobrenadante.

Finalmente el precipitado obtenido se seca al vacío obteniéndose los quantum dots solubles en medio acuoso como un polvo de color pardo.



**Figura 8. Proceso de síntesis de ZnS QDs dopados con  $Mn^{2+}$  y solubilizados con MPA**

La estructura de los QDs propuestos sugiere que el ácido 3-mercaptopropiónico puede enlazarse a los núcleos de ZnS mediante enlaces covalentes coordinados, formando nanopartículas con un recubrimiento que le confiere la solubilidad en agua. El grupo tiol (-SH) del MPA, puede enlazarse a los átomos de Zn del núcleo de los quantum dots y su grupo carboxílico le proporciona a la nanopartícula su solubilidad en medio acuoso.

### C.3. OBTENCIÓN DE ZNS QDS RECUBIERTOS CON DHLA

Tal y como se mencionó en la introducción, el empleo de ligandos bidentados para estabilizar los QDs ofrece un importante número de ventajas en términos de estabilidad coloidal y propiedades tanto luminiscentes como físicas de las nanopartículas dispersas en medios acuosos. Por ello, en una segunda etapa, se decidió modificar el recubrimiento original de los QDs sintetizados en el laboratorio con ácido dihidrolipoico (DHLA).

Para ello, se partió de ácido  $\alpha$ -lipoico al que sometió a una reacción de reducción. La forma reducida, DHLA, se encuentra comercialmente disponible pero a un precio muy elevado. Con el ligando obtenido se procedió a modificar el recubrimiento de MPA por el de DHLA mediante la estrategia de intercambio de ligandos<sup>63</sup>.

### **C.3.1. Reducción del ácido lipoico**

Para la reducción del ácido lipoico en primer lugar se añaden 117 mL de bicarbonato de sodio 0.25 M a 6 g de este ácido en un baño de hielo (0-4°C). Posteriormente es necesario adicionar borohidruro de sodio para que tenga lugar la reacción de reducción. Esta etapa se llevó a cabo mediante la adición a la mezcla inicial de 1.2 g de NaBH<sub>4</sub> en varias pequeñas porciones y bajo agitación.

La mezcla se mantiene con agitación 30 min. A continuación la disolución se acidifica a pH 1 con ácido acético glacial, se añaden 30 mL de tolueno y se extrae la fase orgánica mediante un embudo de decantación. Este proceso se repite tres veces para obtener el máximo rendimiento.

Tras este proceso se elimina el agua de la fase orgánica mediante la adición de sulfato de sodio anhidro y posterior filtración de éste. A continuación se elimina el tolueno al vacío en un rotavapor de presión controlada, obteniéndose un líquido amarillo.

Finalmente puede llevarse a cabo la purificación del DHLA mediante un proceso de destilación a vacío.

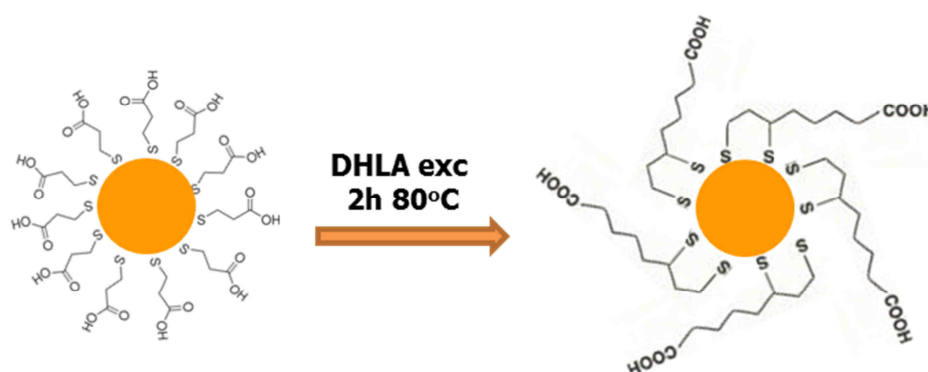
### **C.3.2. Proceso de intercambio de ligandos**

Para la modificación del recubrimiento de las nanopartículas, se deposita 10 mg de polvo de ZnS QDs dopados con Mn<sup>2+</sup> y 1 mL de DHLA en un vial de vidrio. Esta mezcla se mantiene a 80°C en un baño de agua con agitación constante durante 2 horas (el proceso se recoge esquemáticamente en la figura 9). Tras este tiempo se puede continuar con el procedimiento, pero si se mantiene la agitación durante varias horas, el proceso de intercambio de ligandos se ve favorecido.

A continuación se añaden 3-5 mL de metanol y se desprotonan los grupos carboxílicos mediante la adición de exceso de terbutóxido de potasio, añadido en pequeñas cantidades hasta total precipitación de las nanopartículas.

Posteriormente la disolución se centrifuga 5 min a 5000 rpm descartándose el sobrenadante. El precipitado se redissuelve en agua y se lleva a cabo un procedimiento adicional de purificación para eliminar el exceso de reactivos y disminuir el pH mediante ultrafiltración con un Amicon de 10 kDa.

El producto resultante se almacena en agua Milli-Q o en buffer de fosfatos PBS 10 mM pH 7.4, a 4°C hasta su uso.



*Figura 9. Intercambio de ligandos MPA a DHLA*

## C.4. CARACTERIZACIÓN DE LOS QDS FOSFORESCENTES

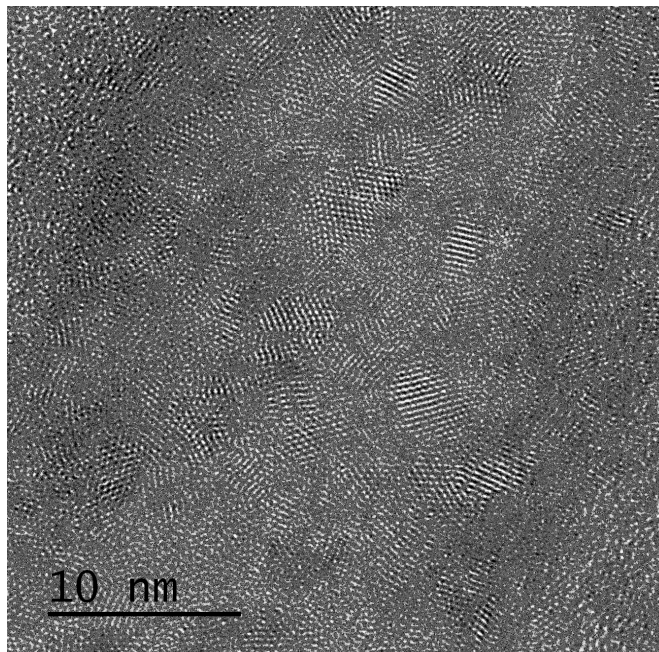
Cuando se trabaja con nanopartículas y en este caso concreto con QDs, es indispensable recurrir a distintas técnicas de caracterización no sólo para conocer su tamaño y comportamiento químico sino también, para conseguir una alta reproducibilidad en la síntesis y control sobre ellas para poder utilizarlas en las condiciones ideales en las aplicaciones que se pretendan desarrollar. Por ello, en este apartado se recogen los diferentes estudios realizados de caracterización, tanto de tamaño y forma de las nanopartículas que se han sintetizado, como de sus propiedades luminiscentes en diferentes entornos químicos. A lo largo del estudio se ha procurado evaluar el potencial bioanalítico de los ZnS QDs dopados con  $Mn^{2+}$  frente a los fosforóforos tradicionales.

### C.4.1. Tamaño y forma

La microscopía de transmisión electrónica es una técnica de imprescindible en los estudios de nanomateriales debido a su gran poder de resolución. Concretamente en el caso de los QDs, permite establecer la forma, estimar el grado de homogeneidad o llevar a cabo la medición precisa del tamaño del núcleo de la nanopartícula. En este trabajo se utilizó la técnica HRTEM (Microscopía de Transmisión Electrónica de alta resolución), ya que con ella se puede obtener una medida más precisa del tamaño de nanopartícula y visualizar los límites del entramado cristalino. Además el equipo utilizado permite obtener la composición elemental de una zona de la imagen mediante EDX (espectroscopía de energía dispersiva de rayos X), lo que permite asegurar que lo que se está visualizando corresponde a un núcleo de la nanopartícula.

En nuestro caso, empleando la técnica HRTEM, se tomaron fotografías de una rejilla de Cu sobre la que se depositó previamente una pequeña cantidad de disolución acuosa de quantum dots de  $Mn^{2+}$ :ZnS con recubrimientos de MPA y de DHLA. A modo de ejemplo, en la

figura 10 se recoge una de las múltiples fotografías obtenidas. Como puede verse la síntesis llevada a cabo originó QDs de forma aproximadamente circular y con una distribución de tamaños homogénea y en torno a 3-4 nm, datos concordantes con la bibliografía encontrada para este tipo de núcleos<sup>61,64</sup>.



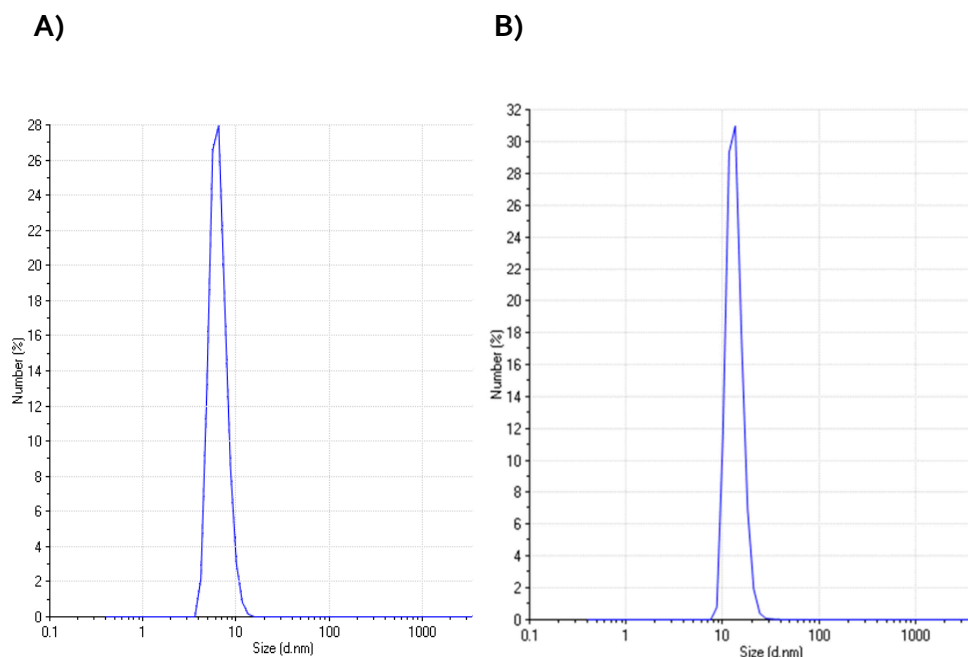
**Figura 10.** Imagen HRTEM de ZnS QDs dopados con Mn<sup>2+</sup> y recubiertos con MPA.

Las fotografías realizadas para los QDs recubiertos con DHLA son muy similares que las del recubrimiento de MPA, con lo que se confirma que los núcleos no sufren aparentes modificaciones en tamaño y forma tras el proceso de intercambio de ligandos.

Hay que tener en cuenta que mediante esta técnica lo que se observan son nanopartículas bajo condiciones de vacío o sequedad. En medio acuoso, cuando los QDs se encuentran dispersos, la morfología o el tamaño pueden ser diferentes. Por ello, para caracterizar el tamaño en medio acuoso, se realizaron medidas de DLS (dispersión de luz dinámica). Esta técnica nos permite conocer la distribución de tamaños teniendo en cuenta tanto el núcleo como el recubrimiento de las nanopartículas, ya que los datos que se obtienen son de medidas de radio hidrodinámico (tamaño del núcleo sumado al del recubrimiento en disolución y entorno de hidratación).

Al realizar las medidas de DLS se encontró que los QDs con recubrimiento de MPA presentan una pequeña dispersión de tamaño, con un diámetro hidrodinámico cercano a los 7 nm. Mientras que en el caso de los QDs solubilizados tras el proceso de intercambio de ligandos, las medidas de DLS muestran que tiene lugar un incremento del diámetro de las nanopartículas alcanzando un valor medio cercano a los 14 nm, por lo que podemos concluir

que el proceso de intercambio de ligandos tiene lugar de forma efectiva (figura 11) y podemos seguir caracterizando los QDs con recubrimiento de DHLA.



**Figura 11. Medidas radio hidrodinámico de QDs de ZnS dopados con Mn<sup>2+</sup> mediante DLS: A) recubiertas con MPA B) recubiertas con DHLA.**

### C.4.2. Asymmetric Flow Field-Flow Fractionation (AF4)

Para completar la caracterización de los QDs se utilizó una técnica híbrida consistente en una técnica muy novedosa y potente de separación en el campo del estudio de las nanopartículas FFF (Field-Flow Fractionation)<sup>65</sup>. Además, puesto que los QDs poseen un núcleo constituido por un número elevado de átomos metálicos, como sistema de detección se utilizó la espectrometría de masas con fuente de acoplamiento inductivo (ICP-MS).

En los procesos de síntesis de QDs se pueden formar nanopartículas o especies secundarias que no tienen la composición de núcleo esperada. El sistema híbrido (AF4-ICPMS) permitiría conocer, gracias al poder de separación, la distribución de tamaños existentes en la disolución coloidal obtenida tras la síntesis de las nanopartículas en el caso de que las muestras estén formadas por diferentes poblaciones. Mediante la detección por ICPMS es posible detectar de forma muy sensible la presencia de metales en estas poblaciones.

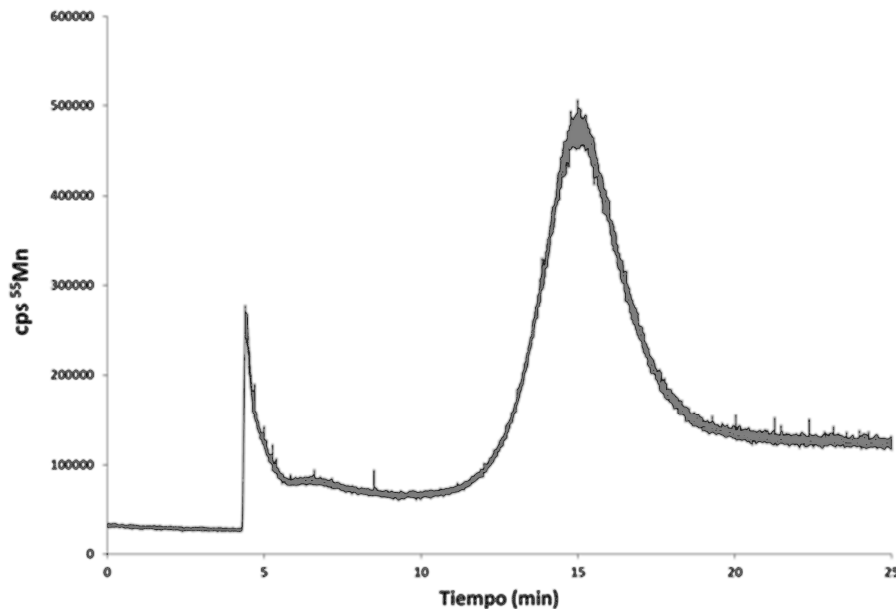
Para realizar este estudio se utilizaron muestras acuosas de QDs de ZnS dopados con Mn<sup>2+</sup> con recubrimiento de DHLA, utilizándose el programa de separación

recogido en la tabla 1, empleándose como fase móvil acetato de amonio 0.1%. Mediante el sistema de detección ICPMS se monitorizó el  $^{55}\text{Mn}$ .

**Tabla 1. Programa de separación utilizado en AF4- ICPMS**

<i>Volumen de inyección</i>	20 $\mu\text{L}$
<i>Tiempo de inyección</i>	4 min
<i>Cross Flow</i>	1.5 mL/min
<i>Rampa</i>	10 min

En la figura 12, se puede observar que cuando se monitoriza el Mn, tras la introducción de los QDs en el sistema AF<sub>4</sub>, el fractograma obtenido presenta un único pico completamente definido, lo que parece indicar que, en principio, tras el proceso de síntesis e intercambio de ligandos sólo se forma una población de nanopartículas conteniendo manganeso bastante homogénea. Los resultados obtenidos mediante AF<sub>4</sub> concuerdan con los anteriormente observados con otras técnicas.



**Figura 12. Fractograma de ZnS QDs dopados con  $\text{Mn}^{2+}$**

Poder aplicar esta técnica a los  $\text{Mn}^{2+}$ :ZnS QDs permitiría llevar a cabo el estudio y caracterización de los bioconjugados obtenidos posteriormente con este recubrimiento,

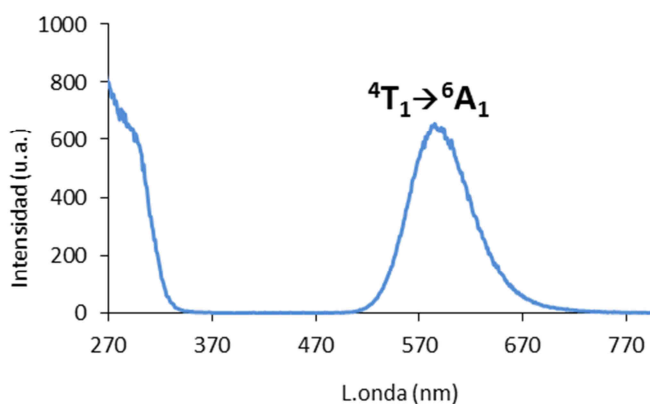
además de la optimización de la reacción de bioconjugación por esta técnica tan novedosa con detección elemental por ICPMS u otros detectores moleculares.

### C.4.3. Características fotoluminiscentes

Para el estudio de las propiedades fotoluminiscentes de los QDs de ZnS dopados con  $Mn^{2+}$  en diferentes entornos químicos se hicieron medidas tanto de espectroscopía fluorescente/fosforescente como de absorción molecular.

Las medidas fosforescentes se llevaron a cabo en discontinuo empleando una celda de luminiscencia de cuarzo convencional (Hellma, modelo 101-QS) con un paso óptico de 10 mm. Las variables instrumentales, incluyendo los anchos de las rendijas de excitación y emisión, los tiempos de demora y apertura, voltaje del detector, etc., fueron debidamente optimizados con el fin de obtener la mayor sensibilidad en la detección de la luminiscencia de los quantum dots evaluados.

En la figura 13, se muestran los espectros de excitación y emisión de los quantum dots de ZnS dopados con manganeso. Como se puede comprobar, se observa la banda de emisión fosforescente esperada, debido a la transición prohibida ( ${}^4T_1 \rightarrow {}^6A_1$ ) que se produce en torno a 590 nm cuando se excita la muestra a una longitud de onda de 290 nm.



**Figura 13. Espectro de emisión fosforescente de una disolución de  $Mn^{2+}$ : ZnS QDs**

Del estudio realizado se seleccionaron las longitudes de onda de excitación y emisión de 290 y 590 nm respectivamente, un tiempo de retardo,  $t_d$  (tiempo tras el cual se comienza a registrar la emisión), de 0.2 ms y un tiempo de apertura,  $t_g$  (tiempo durante el cual se registra la señal), de 5.00 ms, para los estudios posteriores.

Además, los estudios realizados han demostrado que, a pesar del dopaje metálico, se puede registrar también una emisión fluorescente residual en torno a 420 nm (figura 14), propia del núcleo de ZnS sin dopar y que se recoge en la bibliografía<sup>64</sup>.



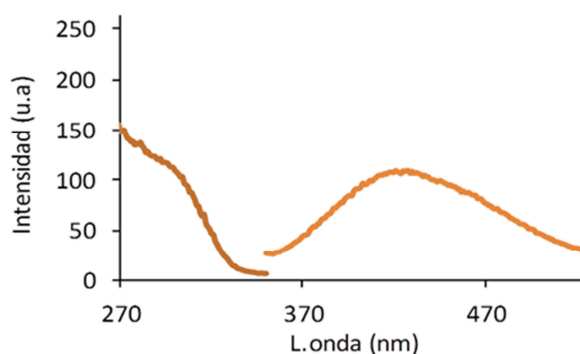


Figura 14. Espectro de emisión fluorescente de una disolución de Mn<sup>2+</sup>: ZnS QDs

En el caso de los espectros de absorbanza molecular se puede encontrar un máximo de emisión a 290 nm (figura 15) correspondiente al excitón de los núcleos de ZnS. Las disoluciones acuosas de este tipo de QDs no presentan coloración.

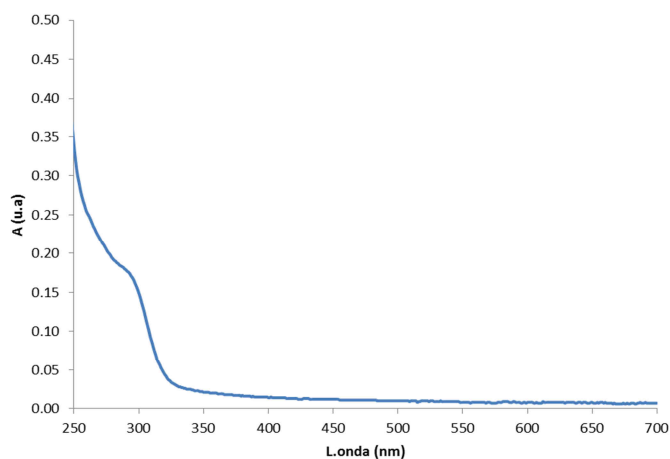


Figura 15. Espectro de absorbanza UV-Vis de una disolución de Mn<sup>2+</sup>: ZnS QDs

Para completar el estudio, se llevaron a cabo medidas del tiempo de vida media de la emisión fosforescente de estos quantum dots. Se encontró que el mejor ajuste de la curva de desactivación (figura 16) coincidía con un ajuste tipo doble exponencial (ecuación 1) donde hay dos componentes: una desactivación rápida  $\tau_1$  y otra lenta  $\tau_2$ . En ambos casos, las vidas medias son del orden de los milisegundos, propios de la emisión fosforescente y mucho mayores que los obtenidos en quantum dots de emisión fluorescente<sup>66</sup>.

$$I_p = A_1 \cdot e^{(-t/\tau_1)} + A_2 \cdot e^{(-t/\tau_2)} + C \quad \text{(Ecuación 1)}$$

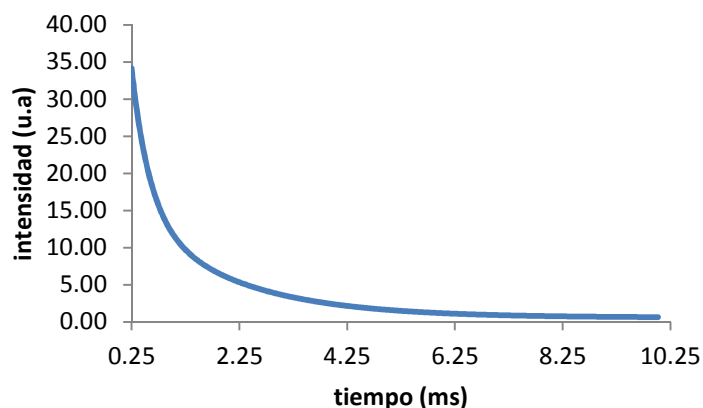


Figura 16. Curva de desactivación de la emisión fosforescente de una disolución de  $Mn^{2+}$ : ZnS QDs

#### C.4.3.1. Efecto del pH

Se evaluó el efecto de variaciones del pH del medio sobre la intensidad de emisión luminiscente de los QDs, así como la absorbancia molecular y los tiempos de vida media. Para ello se prepararon diferentes disoluciones de quantum dots de  $Mn^{2+}$ :ZnS conteniendo todas ellas la misma concentración de nanopartículas pero preparadas a partir de una disolución madre en un medio tampón a diferentes pHs.

Como puede observarse en la figura 17A la intensidad varía ligeramente y aunque es superior para pHs más básicos, se mantiene estable en un rango entre 5.5 y 9. Este intervalo de estabilidad de pH es válido ya que para las aplicaciones bioanalíticas, en las que se utilizan pHs en torno a 7, este recubrimiento nos permitiría trabajar sin necesidad de controlar estrictamente este factor.

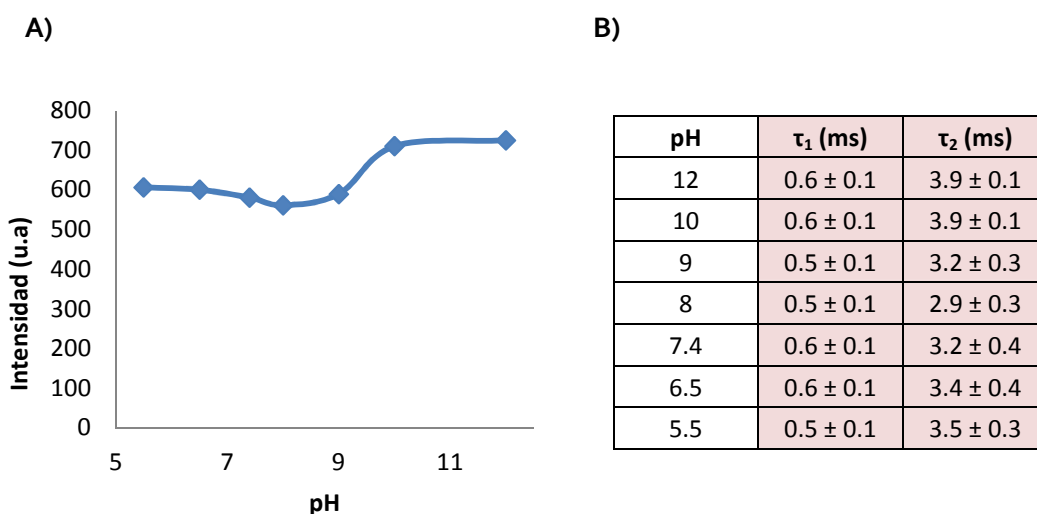


Figura 17. A) Variación de la emisión fosforescente en función del pH B) Tiempos de vida media de disoluciones de QDs fosforescentes a diferentes pHs.

Con objeto de ofrecer una posible explicación al fenómeno observado, hay considerar que el pKa de los grupos funcionales del DHLA (Figura 18) empleado como recubrimiento es cercano a 4.8 para el grupo ácido, y 10.3-10.7 para el grupo tiol cuando se cambia el medio en el que se encuentran los QDs, la acidez del mismo afecta al recubrimiento superficial, siendo este efecto mayor a pHs en torno a 12 (el grupo tiol se encuentra desprotonado).



**Figura 18. pka grupos ácido y tiol DHLA**

En cambio, si se miden los tiempos de vida media de la emisión fosforescente (figura 17B), se observan pequeñas variaciones en la componente más lenta pero que se encuentran dentro del intervalo del error de la medida instrumental.

#### **C.4.3.2. Presencia de átomos pesados**

Es bien sabido que la presencia de aniones como el bromuro o el yoduro favorecen la población del estado triplete excitado cuando se habla de fosforóforos tradicionales, incrementando la intensidad luminiscente. Para evaluar si este factor tiene efecto en los QDs sintetizados, se emplearon disoluciones de quantum dots en disoluciones reguladoras de pH 12 y 7.4 ya que corresponde al de mayor intensidad de emisión y pH más común en medios biológicos respectivamente. Estas disoluciones se prepararon enriquecidas con sales de estos iones en altas concentraciones,  $[\text{NaI}] = 1.2\text{M}$  y  $[\text{KBr}] = 1.2\text{M}$ .

En ningún caso, la emisión de los quantum dots se ve incrementada, siendo los valores más altos obtenidos los correspondientes a la disolución de QDs sin presencia de átomos pesados. Los tiempos de vida media y los espectros de absorbancia tampoco se ven modificados por la presencia de átomos pesados.

#### **C.4.3.3. Efecto del O<sub>2</sub> disuelto**

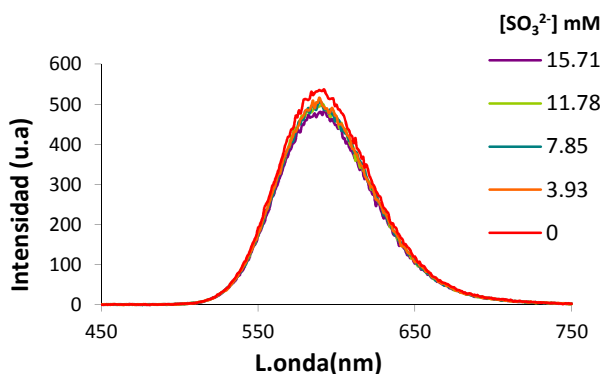
El oxígeno molecular en estado fundamental está en estado triplete, de manera cuando está presente en una disolución con un fosforóforo tradicional, aumenta el cruce intersistemas entre el primer estado singlete excitado y el primer estado triplete excitado. Además, aumenta la vida media del primer estado singlete excitado, haciendo así a la molécula más vulnerable a mecanismos de desactivación no radiantes, por lo que en presencia de oxígeno la fosforescencia disminuye. Por consiguiente, y teniendo en cuenta su elevada solubilidad en medios acuosos, suele ser preciso asegurar su eliminación del medio mediante

el desplazamiento por burbujeo con un gas inerte como Ar o N<sub>2</sub> a través de la disolución o utilizando un desoxigenante químico como el Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub><sup>67</sup>.

Por ello, se llevó a cabo un estudio sobre el efecto de la presencia o ausencia del oxígeno molecular. Para ello se prepararon diferentes disoluciones de quantum dots de Mn<sup>2+</sup>:ZnS (todas ellas con la misma concentración de nanopartículas preparadas a partir de una disolución madre en un medio tampón de PBS a pH 7.4) con concentraciones crecientes de sulfito de sodio como desoxigenante.

Como puede verse en la figura 19 apenas se producen modificaciones significativas en la intensidad ni en el tiempo de vida de la emisión fosforescente. Por tanto, se puede considerar que la emisión de los quantum dots de ZnS dopados con manganeso no depende de los niveles de oxígeno presentes en el medio.

Este aspecto es esencialmente relevante de cara a una futura aplicación bioanalítica de estos fosforóforos, ya que evita la necesidad de realizar el siempre tedioso y costoso proceso de desoxigenación de las muestras (aspecto indispensable en la mayoría de las aplicaciones analíticas a temperatura ambiente).



**Figura 19.** Emisión fosforescente a concentraciones crecientes de sulfito como agente desoxigenante

#### **C.4.3.4. Efecto de la fotoactivación**

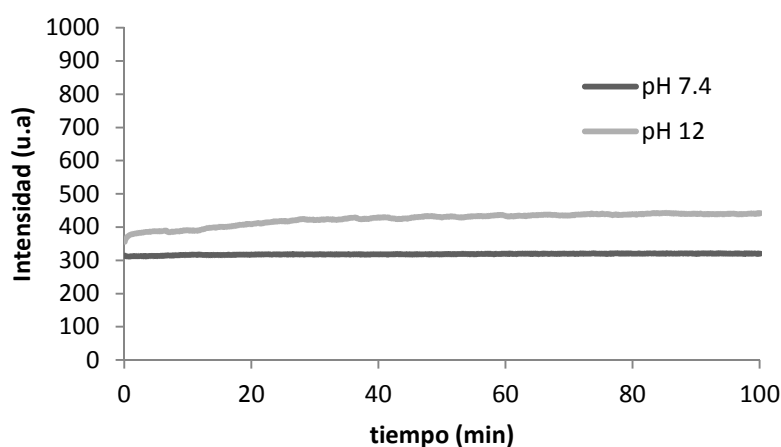
En el caso de nanopartículas de CdSe/ZnS numerosos estudios han puesto de manifiesto que tras un periodo necesario de fotoactivación la emisión se ve considerablemente mejorada. Este fenómeno se atribuye al hecho de que durante este período de exposición a una luz UV de forma continua se producen fenómenos de fotooxidación que eliminan los defectos presentes en la superficie del nanocristal.

Por ello, los quantum dots de  $Mn^{2+}:ZnS$  a pH 7.4 y pH 12 fueron sometidos a un largo período de fotoactivación iluminándolos de forma continua a la longitud de onda de excitación de los mismos ( $\lambda_{exc} = 290nm$ ).

Tal y como muestra la figura 20, la intensidad no se ve alterada, permaneciendo constante para ambos pHs ensayados.

Este comportamiento diferencial observado para los QDs sintetizados con frente al comportamiento descrito para el caso de QDs de distinta naturaleza se puede explicar ya que en la etapa final de la síntesis de estas nanopartículas, son sometidas a un proceso de envejecimiento a temperatura elevada con el que se consigue mejorar su cristalinidad (evitando así la presencia de defectos superficiales). Además, en el proceso de intercambio de ligandos se eleva la temperatura y se mantiene durante por lo menos dos horas, con lo que también se podrían eliminar los defectos que quedasen tras el proceso de síntesis. También puede atribuirse a la intensa emisión fosforescente derivada de la estabilidad que le confiere este recubrimiento a los QDs.

Las curvas de desactivación de la fosforescencia y espectro de absorbancia tampoco mostraron cambios apreciables antes y después del proceso de fotoactivación.



**Figura 20. Monitorización de la emisión fosforescente durante un periodo de fotoactivación:  $Mn^{2+}: ZnS$  QDs con DHLA**

Por tanto, podemos concluir que la emisión de los QDs fosforescentes sintetizados no se ve afectada significativamente por parámetros como la fotoactivación (crítico en el caso de quantum dots convencionales de CdSe o CdS) y tampoco por aquellos que suelen modificar la fosforescencia de fosforóforos orgánicos convencionales (ej. la presencia de oxígeno, los átomos pesados o el empleo de medios organizados). Es decir, este tipo de nanopartículas presenta una emisión fosforescente altamente estable y robusta, no requiriendo tomar

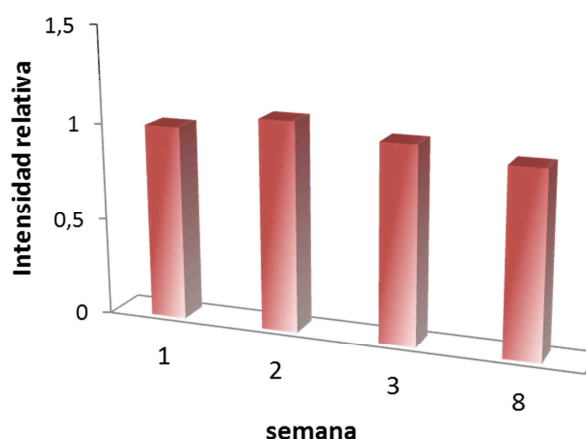
precauciones especiales o no siendo necesario añadir reactivos adicionales para obtener una emisión luminiscente intensa.

Es por esto que los nanocristales de ZnS dopados con manganeso se pueden considerar una herramienta analítica muy robusta para desarrollar metodologías analíticas fosforescentes para llevar a cabo la detección directa de analitos de interés.

#### **C.4.4. Estabilidad a largo a plazo**

Estudios llevados a cabo por distintos grupos de investigación han puesto de manifiesto la limitada estabilidad coloidal de los QDs de CdSe cuya superficie se ha modificado mediante el proceso de intercambio de ligandos, no se consiguen obtener QDs estables a largo plazo. Para evaluar la estabilidad coloidal de los QDs modificados con DHLA tras el proceso de intercambio de ligandos se prepararon disoluciones acuosas de los mismos en buffer SBB pH 12. Se tomaron alícuotas cada cierto periodo de tiempo y se midió la emisión fosforescente. Para poder realizar estas medidas de forma que las variaciones de la señal proporcionada por el equipo no afectaran a este estudio, se utilizó como patrón una disolución de  $\alpha$ -bromonaftaleno  $10^{-4}$  M.

Los resultados obtenidos se recogen en la figura 21. Como se puede ver la emisión no se ve alterada significativamente con el tiempo, incluso tras 8 semanas de almacenamiento a temperatura ambiente y a la luz. Esta estabilidad superior a otros QDs estabilizados mediante intercambio de ligandos puede explicarse debido a los dos puntos de anclaje a la nanopartícula que posee el DHLA, haciendo más estable el recubrimiento y dificultando la desorción de los ligandos.



**Figura 21. Evaluación de la estabilidad a largo plazo**

## C.5. DESARROLLO DE UN INMUNOENSAYO PARA LA DETECCIÓN DE PSA

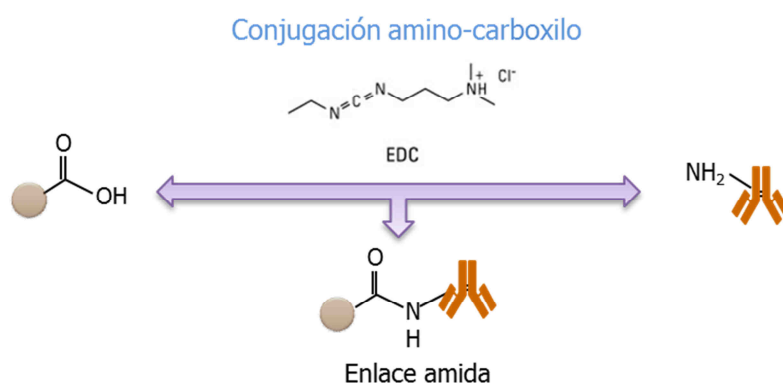
Una vez llevada a cabo la síntesis, solubilización y caracterización de los QDs se llevó a cabo la funcionalización de los mismos con anticuerpos. En este punto, se ha de comentar que en las primeras pruebas en lugar de utilizar los reactivos necesarios para el inmunoensayo para la PSA, se utilizó una inmonoglobulina G (IgG) de rata contra IgG+IgM de conejo. De la misma manera, el formato inicial de inmunoensayo es distinto al desarrollado finalmente. Se procedió de esta forma para optimizar recursos (menor costo de los anticuerpos utilizados) y puesto que inicialmente el objetivo planteado era únicamente evaluar el potencial analítico y la posibilidad de utilizar los QDs fosforescentes como marcas en inmunoanálisis.

### C.5.1. Bioconjugación QDs-anticuerpo

#### C.5.1.1. Bioconjugación vía carbodiimida

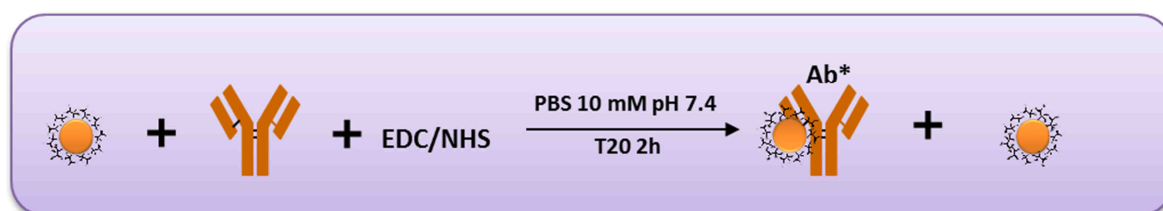
Una vez solubilizados y estabilizados los QDs en medios acuosos, el siguiente paso para poder emplearlos en aplicaciones bioanalíticas consiste en funcionalizar la superficie de las nanopartículas con moléculas que tengan la capacidad de realizar un reconocimiento selectivo de la especie de interés (por ejemplo a biomoléculas tales como ADN, ARN, oligonucleótidos, péptidos, anticuerpos, etc.). Con este propósito se han descrito, con éxito, distintas estrategias para la conjugación o unión de estas biomoléculas a QDs. Así dentro de las diversas estrategias propuestas, los QDs que han sido modificados con grupos amino o carboxílicos facilitan la formación de una unión específica y estable con la molécula funcional de interés a través de la creación de un enlace covalente entre ellos.

En esta línea, en este trabajo se ha llevado a cabo el marcaje de anticuerpos mediante una estrategia que se basa en la química de la carbodiimida (EDC), que consiste en el establecimiento de un enlace amida entre los QDs y la molécula funcional de reconocimiento (figura 22).



**Figura 22. Estrategia de bioconjugación mediante el uso de la química de EDC**

La reacción de bioconjugación se consigue experimentalmente en el laboratorio, mezclando en un Eppendorf las cantidades requeridas de anticuerpo (IgG de rata contra IgG+IgM de conejo), QDs y EDC (N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etil-carbodiimida hidroclicorada) y NHS (N-hidroxisuccidimida) en relaciones (en ppm) 1 : X : X/2.5 : X/5, en buffer de PBS 10 mM pH 7.4 y tween 20 0.05%. La mezcla se deja reaccionar a temperatura ambiente con agitación continua durante 2 horas. Esta reacción sucederá a través de los grupos carboxilo del recubrimiento de las nanopartículas y los grupos amino del anticuerpo, formándose un enlace amida (figura 23).



**Figura 23. Esquema de bioconjugación de ZnS QDs dopados con Mn<sup>2+</sup> al anticuerpo**

La reacción de bioconjugación no se produce al 100%, por lo que tras el marcaje del anticuerpo con los QDs se requiere una etapa de purificación donde se eliminarán los excesos de reactivos y los productos secundarios que se puedan haber formado. Dicha etapa es de vital importancia para asegurarnos de que al final tenemos completamente aislado el bioconjugado deseado, sobre todo de los QDs libres. Se ha comprobado que la longitud de onda de emisión de los QDs no varía tras el proceso de bioconjugación, por ello al poner un exceso de estos para conseguir que todo el anticuerpo esté marcado, es necesaria su separación para no observar emisión procedente de QDs libres.

Existen diferentes estrategias de purificación en función de las características del bioconjugado obtenido y de la naturaleza de los QDs. Así, las inmunoglobulinas tienen un peso molecular entre 140-160 kDa, con lo que en principio los bioconjugados con QDs tendrán un tamaño mayor y es suficiente con utilizar un dispositivo de ultrafiltración con un cut-off de 100 kDa para eliminar los QDs libres. Este fue, por ello, el procedimiento que se ha seguido de purificación, encontrándose que resultó ser efectivo (tal y como se esperaba).

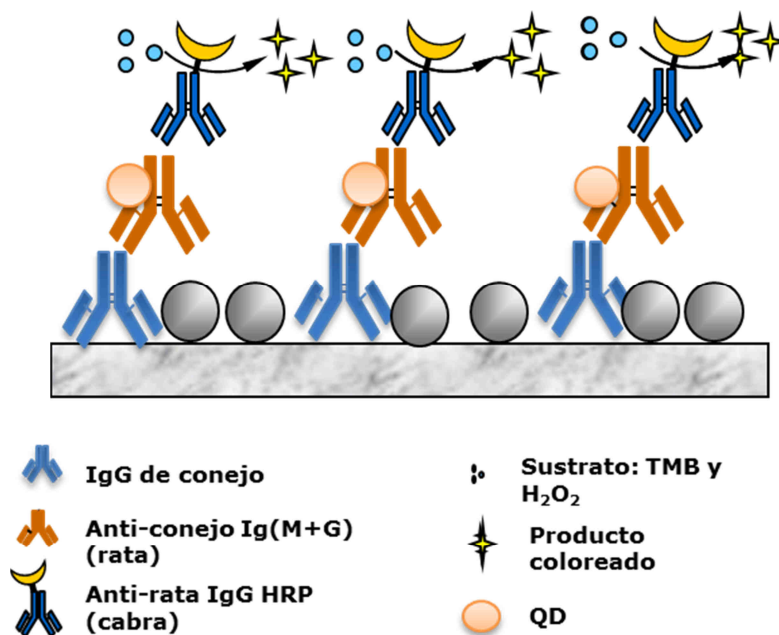
#### **C.5.1.2. Funcionalidad del bioconjugado y relación QD-Ab**

Si se conjugan los residuos de los anticuerpos que forman parte de los lugares de reconocimiento del antígeno (parátomos), es posible que se pierda la funcionalidad de éste y como consecuencia no reconozca al antígeno. Por ello, se ha de comprobar que tras el marcaje del anticuerpo con los QDs el bioconjugado mantiene su funcionalidad. Por otro lado, al introducir mayor número de QDs por anticuerpo la señal analítica será superior, por lo que



se debe llegar a un compromiso entre la funcionalidad y el número de QDs bioconjugados al anticuerpo.

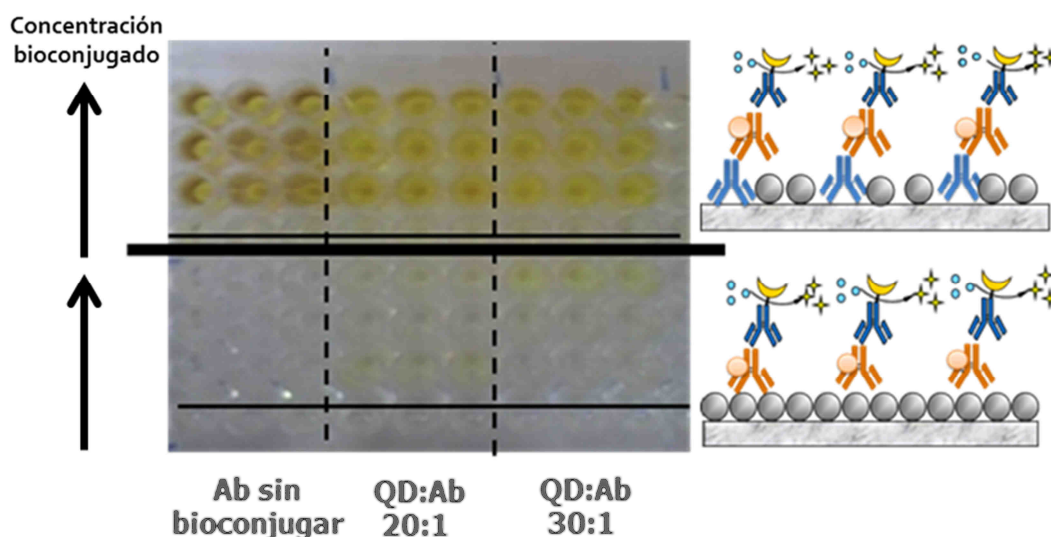
Para ello se realizó un ELISA espectrofotométrico, cuyo esquema se encuentra recogido en la figura 24. En primer lugar se tapiza con un anticuerpo genérico de conejo (100  $\mu$ L/pocillo de 10  $\mu$ g/mL en PBS 10 mM pH 7.4), esta disolución se deja incubar 16 horas a 37°C, a continuación se tira la disolución y se bloquea la placa con BSA (200  $\mu$ L/pocillo al 1%) y se deja incubar toda la noche a 4°C. Se tira la disolución y se lava la placa con 3x200  $\mu$ L buffer de lavado (PBS 10 mM pH 7.4, tween20 0,05%). Tras este paso se añaden 100  $\mu$ L/pocillo de bioconjugado (relaciones QDs:Ab añadidas en la bioconjugación 30:1, 20:1, 10:1 y 5:1 en ppm) y anticuerpo sin bioconjugado de 1250, 750, 500, 250 ng/mL. A continuación, tras un proceso de lavado igual al anterior, se añaden 100  $\mu$ L/pocillo de anticuerpo anti-rata marcado con HRP en una dilución 1:1000 (peroxidasa de rábano silvestre) que, tras 2 horas de incubación y posterior lavado, cataliza la reacción del TMB (3,3',5,5' tetrametilbenzidina) en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100  $\mu$ L/pocillo TMB:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1:1) para dar lugar a un producto coloreado. Finalmente, tras un tiempo en el que se desarrolla el color, se para la reacción con 50  $\mu$ L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M.



**Figura 24. Esquema inmunoensayo ELISA espectrofotométrico**

Se evaluaron las posibles adsorciones inespecíficas en función de la concentración de bioconjugado añadida, que en principio se pudiesen presentar en el inmunoensayo debidas a los QDs. Para ello, en la mitad inferior de la placa se realizó el mismo procedimiento descrito anteriormente pero sin añadir anticuerpo de tapizado, con lo que no se debería desarrollar color. A modo de ejemplo, en la figura 25 se muestra la placa obtenida para los bioconjugados

20:1 y 30:1 frente al anticuerpo sin bioconjugar. Podemos observar que ambos casos se desarrolla ligeramente algo menos de color, pero esto puede atribuirse a las diferentes diluciones que sufre el bioconjugado durante los procesos, ya que para relaciones más bajas se obtienen resultados similares. En la parte inferior de la placa se puede observar algo de coloración, lo que podría indicar ligeras adsorciones inespecíficas por parte del bioconjugado, pero a medida que se disminuye la concentración estas señales desaparecen.



**Figura 25. Inmunoensayo espectrofotométrico obtenido para relaciones QDs: Ab 20:1 y 30:1**

Se realizaron medidas de fosforescencia en disolución de los distintos bioconjugados en la misma concentración. Los resultados obtenidos (figura 26) indican que a medida que se aumenta la relación QDs: anticuerpo añadida en la reacción, se incrementa la señal de fosforescencia. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos para las medidas de fosforescencia en disolución y mediante el inmunoensayo espectrofotométrico, se decidió utilizar en los experimentos posteriores una relación QDs:anticuerpo de 30:1, ya que no se observa una pérdida apreciable de funcionalidad siendo máxima la señal de fosforescencia. Así mismo, se optó por emplear una concentración de bioconjugado de 1000 ng/mL ya que las adsorciones inespecíficas no parecen importantes.

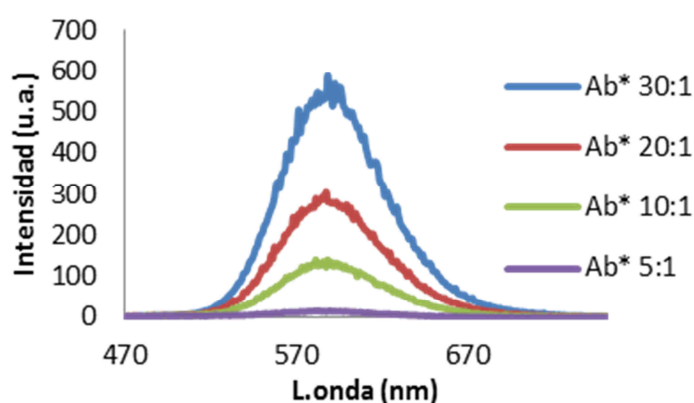


Figura 26. Medidas de fosforescencia en disolución para diferentes relaciones QDs: Ab

## C.5.2. Diseño del inmunoensayo para PSA

Tras la comprobación y optimización de la reacción de bioconjugación se procedió a desarrollar el inmunoensayo para PSA.

### C.5.2.1. Consideraciones preliminares

En este trabajo se optó por el desarrollo de un inmunoensayo con formato tipo sándwich (no competitivo) en microplacas ELISA, tal como se muestra en la figura 27. Se han seleccionado dos anticuerpos anti-PSA de diferentes especies (conejo y ratón) para llevar a cabo el inmunoensayo para el reconocimiento de la PSA y, en una etapa posterior, la detección se lleva a cabo empleando un anticuerpo secundario (cabra) marcado con QDs para la detección del sándwich formado.

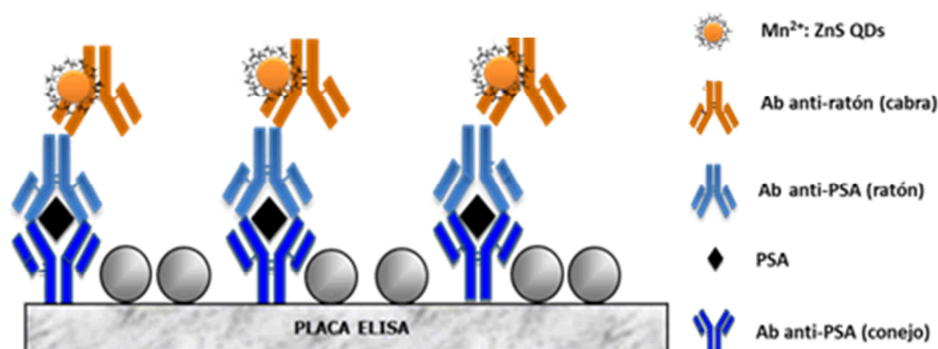
Se ha decidido desarrollar este formato de análisis por los siguientes motivos:

1. El marcaje del anticuerpo secundario (que no forma parte del sándwich) con las nanopartículas evita posibles problemas de atenuación de la funcionalización del anticuerpo primario, encargado del reconocimiento de la proteína de interés.
2. Este formato constituye una plataforma genérica que en principio permitía utilizar un sistema similar para la determinación de otras proteínas o biomoléculas, tan solo empleando anticuerpos primarios distintos (específicos del analito de interés), y utilizando el mismo anticuerpo secundario marcado con QDs. Es decir, de esta forma, no sería necesario repetir y optimizar el proceso complejo de bioconjugación anticuerpo-QD cada vez que se cambiase de analito.
3. Se decidió realizar un inmunoensayo tipo sándwich ya que este formato permite alcanzar mejores límites de detección en muestras complejas.

4. Se emplearon anticuerpos de diferentes especies para evitar en lo posible reacciones cruzadas entre estos.

### C.5.2.2. Procedimiento experimental

La preparación del inmunoensayo cuyo esquema se recoge en la figura 27 consta de varios pasos. Tras llevar a cabo el tapizado de los pocillos de la placa ELISA con el anticuerpo de captura anti-PSA de conejo (100  $\mu\text{L}$  de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en PBS 10 mM pH 7.4), esta disolución se deja incubar 16 horas a 37°C, a continuación se elimina la disolución y se bloquea la placa con BSA (200  $\mu\text{L}$  al 1%) y se deja incubar toda la noche a 4°C. A partir de este punto, se debe asegurar una etapa de lavado de la placa tras cada adición de reactivo con buffer de lavado (PBS 10 mM pH 7.4, tween20 0,05%), todas las posteriores incubaciones se realizan durante 2 horas a 37°C. Tras el bloqueo se añaden 100  $\mu\text{L}$  de PSA de concentración a ensayar, a continuación el segundo anticuerpo que formará el sándwich que será anti-PSA de ratón (100  $\mu\text{L}$  de 300 ng/mL). Finalmente se añaden 100  $\mu\text{L}$  del bioconjugado de 1000 ng/mL y tras la incubación se realiza un último lavado.

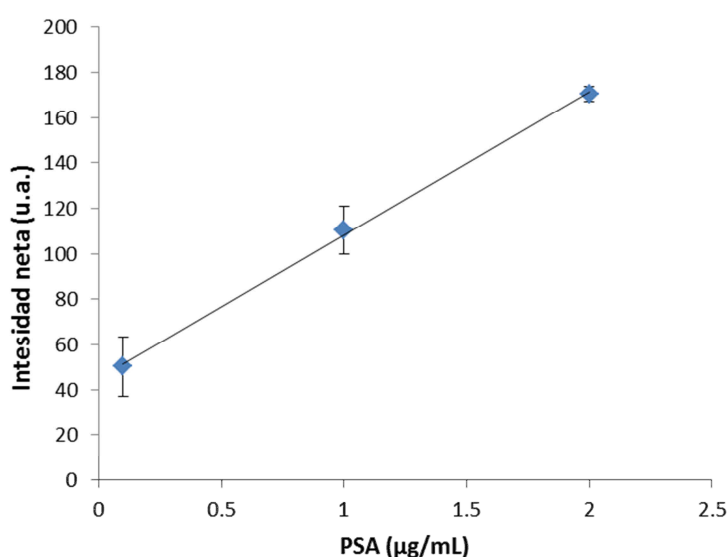


*Figura 27. Esquema del inmunoensayo tipo sándwich para PSA*

### C.5.3. Fosfoinmunoensayo

Para evaluar el potencial analítico de los QDs como marcas fosforescentes, se realizó un calibrado con concentraciones de PSA en un rango de 0.1 a 2000 ng/mL (incluyendo 0 ng/mL de PSA) mediante el procedimiento descrito en el apartado anterior. Para las medidas de fosforescencia se eligieron placas ELISA blancas, ya que debido al diseño óptico del equipo, ofrecían una mayor señal. Las placas ELISA tras el inmunoensayo se miden secas en un espectrofotómetro de fluorescencia Varian Cary Eclipse (Madrid, España) equipado con lector de placas.

La recta de calibración obtenida se muestra en la figura 28. Se consiguió una relación lineal ( $I_{neta} = 0.63 \times PSA (\mu g/mL) + 45.122$   $R^2 = 0.9991$ ) para el intervalo de concentraciones más alto ensayado con una buena precisión. Sin embargo, para las concentraciones más bajas la intensidad de fosforescencia no se puede distinguir de la correspondiente al blanco. Esto puede deberse a que la concentración de bioconjugado añadida es demasiado elevada, con lo que para las concentraciones altas sí es posible discriminar la señal específica de la del blanco. Optimizando las distintas concentraciones de los anticuerpos que forman el sándwich, así como la del bioconjugado en principio parece posible que se consigan llegar a detectar concentraciones más bajas de PSA.

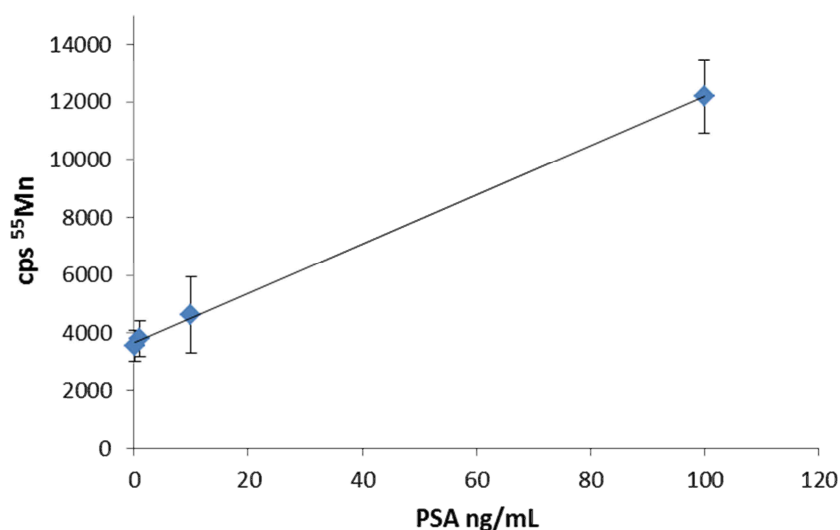


**Figura 28. Recta de calibrado de PSA para medidas de fosforescencia**

#### **C.5.4. Amplificación elemental y medida por ICPMS**

Para evaluar el potencial de los QDs sintetizados para metodologías de amplificación elemental en inmunoensayos con detección por ICP-MS se empleó la placa ELISA utilizada en la obtención de la curva de calibrado anteriormente descrita con el mismo intervalo de concentraciones de PSA (rango de 0.1 a 2000 ng/mL incluyendo 0 ng/mL de PSA). Para llevar a cabo las medidas elementales por ICP-MS es preciso extraer los QDs de los pocillos de la placa ELISA. Para ello, se añadieron 250 µL/ pocillo de buffer de borato de sodio (SBB) 50mM pH 12. La placa se mantiene a temperatura ambiente durante 30 min y posteriormente se extraen 100 µL y se diluyen hasta 4 mL con agua miliQ. Las disoluciones se miden mediante un ICPMS modelo Agilent 7700 Series monitorizando  $^{55}\text{Mn}$ .

La recta de calibración obtenida se muestra en la figura 29. A diferencia de las medidas de fosforescencia se consiguió una mejor relación lineal para concentraciones más bajas de PSA añadidas ( $\text{cps } ^{55}\text{Mn} = 85 \times \text{PSA (ng/mL)} + 3687$   $R^2 = 0.9994$ ). Con lo que en las condiciones actuales, sin optimizar, es posible detectar concentraciones más bajas de PSA que mediante la detección por fosforescencia.



**Figura 29. Recta de calibrado de PSA para medidas de fosforescencia**

Ha de puntualizarse, que no se digirieron las muestras con ácido nítrico, factor que podría afectar a los procesos de nebulización e ionización con lo que se vería disminuida la sensibilidad. No se realizó este procedimiento ya que se podría realizar la posterior amplificación metálica sobre la misma disolución utilizada para las medidas de ICPMS, aunque se debe realizar un estudio futuro de la influencia de la digestión en las señales que se puedan obtener. Ha de hacerse notar, que es posible realizar medidas por fosforescencia e ICPMS con el mismo ensayo, tras un simple tratamiento de las muestras.

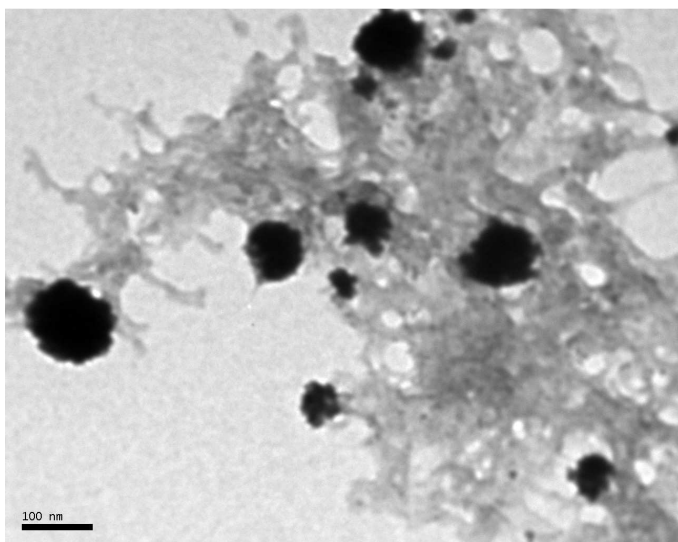
## **C.6. AMPLIFICACIÓN METÁLICA**

Como se comentó en la introducción, la amplificación metálica por deposición catalítica de oro o plata sobre la superficie de nanopartículas de oro como consecuencia de un proceso de reducción es un suceso conocido. En el caso de los QDs este tipo de actividad catalítica aun está por explorar. Por ello, haciendo una primera aproximación a estos procesos, se prepararon disoluciones acuosas de 40 ppm de QDs (1 mL) a las que se le añadieron por separado 100  $\mu\text{L}$  de disoluciones 1:1 en volumen de i)  $\text{AgNO}_3$  2000 ppm+ hidroquinona 5000 ppm (en buffer de citrato pH 3.5) ii)  $\text{HAuCl}_4$  5 mM + hidroxilamina 10 mM.

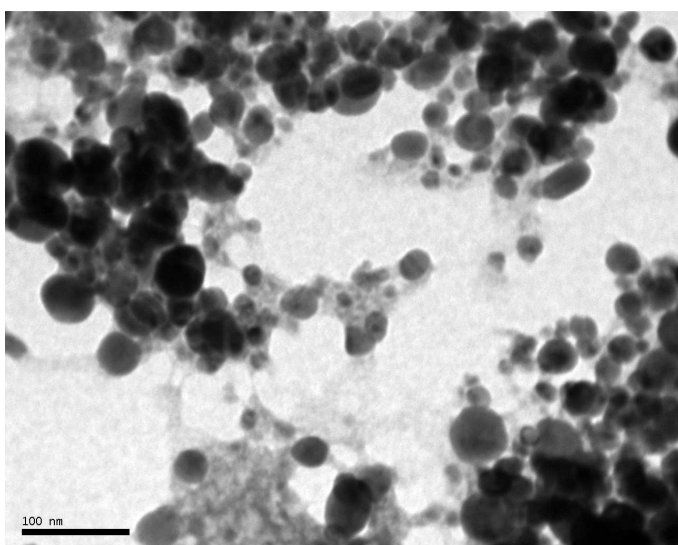
Tras unos pocos minutos, las disoluciones de QDs transparentes toman color (verde en el primer caso y morado en el segundo). Las disoluciones se depositaron en una rejilla de cobre, se secaron y se tomaron fotografías mediante microscopía de transmisión electrónica.

En las imágenes obtenidas (figura 30) se pueden observar formaciones con un tamaño superior (llegando a alcanzar en algunos casos los 100 nm) al núcleo de los QDs sintetizados que es de alrededor de 3-4 nm, los cuáles sólo se observan con claridad cuando se utiliza la microscopía electrónica de alta resolución (HRTEM). En las fotografías se puede ver que son formaciones metálicas, ya que las zonas donde hay partículas son mucho más oscuras y presentan mayor contraste debido a la densidad electrónica del oro y la plata.

A)



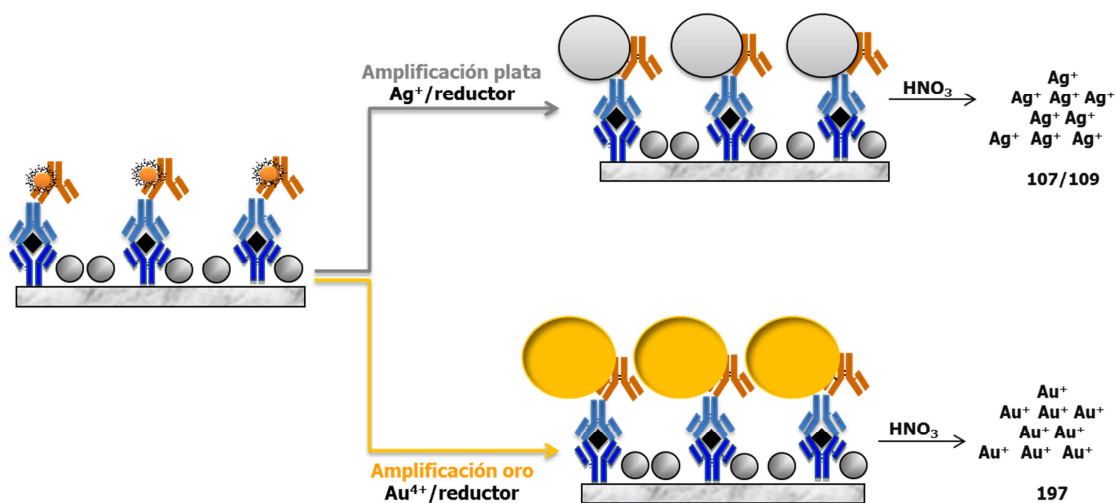
B)



**Figura 30. Fotografías TEM Mn<sup>2+</sup>:ZnS QDs A)Tras amplificación con oro B) Tras amplificación con plata**

Estos estudios preliminares parecen indicar que la amplificación metálica sobre la superficie de QDs también tiene lugar, al igual que con las nanopartículas de oro. Con lo que se podrían realizar inmunoensayos empleando estas propiedades, amplificando los QDs con estos metales y llevando a cabo la digestión de estas partículas formadas para medir posteriormente la composición de oro o plata por ICPMS (figura 31).

Otra opción, como se comentó brevemente en el apartado anterior, sería extraer los QDs de los pocillos y realizar la amplificación en disolución, separando finalmente las partículas del exceso de reactivos. Estos procesos son muy simples de llevar a cabo experimentalmente, pero son complicados de controlar ya que factores como el pH, concentración de semillas (nanopartículas), concentraciones instantáneas de iones metálicos y reductor empleado, influyen en el tamaño y la forma de las estructuras obtenidas. Por todo ello, en un futuro se seguirán estudiando los procesos que tienen lugar y cómo optimizarlos para su aplicación a inmunoensayos y conseguir alcanzar límites de detección extremadamente bajos.



**Figura 31. Esquema del inmunoensayo con amplificación metálica**



## ***D. CONCLUSIONES***

De los estudios y resultados experimentales llevados a cabo, se puede destacar los siguientes aspectos:

- En la búsqueda de QDs fosforescentes y estables en medios acuosos, se ha podido comprobar que la estrategia de dopaje de nanopartículas con base ZnS con  $Mn^{2+}$  da lugar a QDs altamente luminiscentes, con características propias de la fosforescencia. Se ha modificado la superficie de los QDs con ligandos monodentados (MPA) y bidentados (DHLLA), siendo los ligandos bidentados los que proporcionan una mayor estabilidad coloidal de las nanopartículas.
- Estas nanopartículas han sido caracterizadas empleando microscopía electrónica de transmisión, DLS y medidas de fotoluminiscencia, encontrando que se han obtenido nanocristales monodispersos de forma circular con una distribución de tamaños similares y en torno a 3-4 nm (tal y como se esperaba para este tipo de núcleos). De los estudios de fotoluminiscencia se puede observar una intensa banda de emisión fosforescente (sin necesidad de llevar a cabo una fotoactivación previa) para los QDs de  $Mn^{2+}$ : ZnS que aparece en torno a 590nm (coincidente con la transición prohibida ( ${}^4T_1-{}^6A_1$ ) que se produce). Estos QDs presentan, además, una vida media del orden de los milisegundos, propios de la emisión fosforescente y mucho mayores que los obtenidos en QDs fluorescentes.
- Se ha demostrado que las propiedades luminiscentes de los QDs dopados no se ven afectadas por las variables del entorno que afectan típicamente a los fosforóforos convencionales (pH, concentración de  $O_2$ , presencia de átomos pesados) con lo que en este sentido los QDs de ZnS dopados con  $Mn^{2+}$  superan en prestaciones a los fosforóforos orgánicos convencionales.
- Se ha conseguido llevar a cabo la bioconjugación de los QDs fosforescentes a anticuerpos, proporcionando bioconjugados. Esto permitiría el desarrollo de estrategias de detección de proteínas mediante inmunoensayos fosforescentes de forma reproducible, muy sensible y selectiva, debida tanto a la especificidad del anticuerpo como de la fosforescencia propia de ZnS QDs dopados con manganeso.
- Se llevó a cabo la evaluación del potencial analítico del empleo de estos QDs en el desarrollo de un inmunoensayo fosforescente de PSA. Se investigó así mismo la capacidad de amplificación elemental empleando el ICP-MS como sistema de detección. Aunque no se llegaron a alcanzar concentraciones extremadamente bajas, se pudo

comprobar que estas metodologías tienen un gran potencial tras futuras necesarias optimizaciones.

- Los QDs de ZnS dopados con manganeso han sido estudiados como semillas en procesos de amplificación metálica con oro y plata, concluyéndose que los procesos tienen lugar y que podrían ser empleados para llevar a cabo futuros inmunoensayos con amplificación metálica para poder detectar concentraciones extremadamente bajas.

Por otro lado, las conclusiones de aprendizaje derivadas de la realización del presente Proyecto Fin de Máster se resumen a continuación:

- Se han llevado a cabo búsquedas bibliográficas en bases de datos científicas y se ha aprendido a ser capaz de gestionar adecuadamente la información obtenida, mejorando así la capacidad de análisis y síntesis.
- Se ha mejorado la capacidad para el trabajo en grupo, así como para relacionarse con científicos de otros campos (inmunología), aspecto indispensable para llevar a cabo investigación multidisciplinar de calidad.
- Se ha interpretado la información obtenida en el laboratorio con las distintas técnicas de análisis seleccionadas para resolver eficientemente problemas analíticos, y se ha desarrollado la capacidad de tomar decisiones en función de los resultados obtenidos.
- Familiarización con la síntesis, manipulación y caracterización de nanopartículas luminiscentes y su empleo en el análisis químico

## ***E. BIBLIOGRAFÍA***

- 
- <sup>1</sup> **"Quantum dots as luminescent probes in biological systems"**. A.J. Sutherland, *Curr. Opin. Solid St. M.* 6 (2002) 365.
- <sup>2</sup> **"Semiconductor Clusters, Nanocrystals, and Quantum Dots"**. A.P. Alivisatos, *Science* 271 (1996) 933.
- <sup>3</sup> **"Optical Sensing with Quantum Dots"**. C.J. Murphy, *Anal. Chem.* 74 (2002) 520A.
- <sup>4</sup> **"Room temperature phosphorescence optosensing of benzo[a]pyrene in water using halogenated molecularly imprinted polymers"**. Traviesa-Alvárez J. M., Sanchez-Barragán I., Costa-Fernández J.M., Pereiro R. and Sanz-Medel A. *Analyst*, 132, (2007), 218 .
- <sup>5</sup> **"Avidin: A Natural Bridge for Quantum Dot-Antibody Conjugates"**. E.R. Goldman, E.D. Balighian, H. Mattoussi, M.K. Kuno, J.M. Mauro, P.T. Tran, G.P. Anderson, *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 6378.
- <sup>6</sup> **"Advances in fluorescence imaging with quantum dot bio-probes"**. F. Pinaud, X. Michalet, L.A. Bentolila, J.M. Tsay, S. Doosel, J.J. Li, G. Iyer, S. Weiss, *Biomaterials* 27 (2006) 1679.
- <sup>7</sup> **"A toxicologic review of quantum dots: toxicity depends on physicochemical and environmental factors"**. R. Hardman, *Environ. Health Perspect* 114 (2006) 165.
- <sup>8</sup> **"Efficient emission from core/(doped) Shell nanoparticles: Applications for chemical sensing"**. R. Thakas, Y. Chen, P.T. Snee, *Nanoletters* 7 (2007) 3429.
- <sup>9</sup> **"Synthesis and optical properties of ZnS:Cu(II) nanoparticles"**, M. Wang, L. Sun, X. Fu, C. Liao, C. Yan, *Solid State Commun.* 115 (2000) 493.
- [10] **"Electroluminescent properties of device based on ZnS:Tb/CdS core-shell nanocrystals"** R. Hua, J. Niu, M. Li, T. Yu, W. Li, *Chem. Phys. Lett.* 419 (2006) 269.
- <sup>10</sup> **"Effect of pH on photoluminescence enhancement in Pb-doped ZnS nanoparticles"**, P.H. Borse, W. Vogel, S.K. Kulkarni, *J. Colloid Interf. Sci.* 293 (2006) 437.
- <sup>11</sup> **"Luminescence in colloidal Mn<sup>2+</sup>-doped semiconductor nanocrystals"**, R. Beaulac, P.I. Archer, D.R. Gamelin, *J. Solid State Chem.* 181 (2008) 1582.
- <sup>12</sup> **"Spin-polarizable excitonic luminescence in colloidal Mn<sup>2+</sup>-doped CdSe quantum dots"**, R. Beaulac, P.I. Archer, X. Liu, S. Lee, G.M. Salley, M. Dobrowolska, J.K. Furdyna, D.R. Gamelin, *Nanoletters* 8 (2008) 1197.
- <sup>13</sup> **"Flow-through optosensing of 1-naphthaleneacetic acid in water and apples by heavy atom induced-room temperature phosphorescence measurements"**. Fernández-Argüelles M.T. et al; *Talanta*. 66 (2005) 696.
- <sup>14</sup> **"The influence of surface coating on the properties of water-soluble CdSe and CdSe/ZnS quantum dots"**. Coto-García A.M, Fernández-Argüelles M.T., Costa-Fernández J.M.,Sanz-Medel A., Valledor M., Campo J.C. Ferrero F.J., *J Nanop Res*, 15 (2013) 1330.
- <sup>15</sup> **"Aqueous synthesis of thiol-capped CdTe Nanocrystals: State of the art."** A. L. Rogach, T. Franzl, T. A. Klar, J. Feldmann, N. Gaponik, V. Lesnyak, A. Shavel, A.Eychmüller, Y. P. Rakovich, J. F. Donegan, *Journal of Physical Chemistry C*, 111 (2007) 14628.
- <sup>16</sup> **"Biosynthesis of luminescent quantum dots in an earthworm"**. S. R. Stürzenbaum, M. Höckner, A.Panneerselvam, J. Levitt, J-S. Bouillard, S.Taniguchi, L-A. Dailey, R. Ahmad Khanbeigi, E. V. Rosca, M. Thanou, K. Suhling, A. V. Zayats & M. GreenNature *Nanotechnology*. 8 (2013) 57
- <sup>17</sup> **"Chemical analysis and cellular imaging with quantum dots"**, A.M. Smith, S. Nie, *Analyst* 129 (2004) 672.
- <sup>18</sup> **"Biomolecule-Based Nanomaterials and Nanostructures"** I. Willner and B. Willner. *Nano Lett.* 10 (2010) 3805.

- <sup>19</sup> **"Nanoparticles as fluorescent labels for optical imaging and sensing in genomics and proteomics"**. Coto-García A.M., Sotelo-González E., Fernández-Arguelles M.T., Costa-Fernández J.M. and Sanz-Medel A., *Anal Bioanal Chem*, 399 (2011) 29.
- <sup>20</sup> **"Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots"**. X.Y. Wu, H.J. Liu, J.Q. Liu, K.N. Haley, J.A. Treadway, J.P. Larson, N.F. Ge, F. Peale, M.P. Bruchez, *Nature Biotechnology* 21 (2003) 41.
- <sup>21</sup> **"In vivo imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles"**, B. Dubertret, P. Skourides, D.J. Norris, V. Noireaux, A.H. Brivanlou, A. Libchaber, *Science* 298 (2002) 1759.
- <sup>22</sup> **"Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels"**, M. Bruchez, M. Moronne, P. Gin, S. Weiss, P. Alivisatos, *Science* 281 (1998) 2013.
- <sup>23</sup> **"Synthesis and properties of biocompatible water-soluble silica-coated CdSe/ZnS semiconductor quantum dots"**. D. Gerion, F. Pinaud, S.C. Williams, W.J. Parak, D. Zanchet, S. Weiss, A.P. Alivisatos, *J. Phys. Chem. B* 105 (2001) 8861.
- <sup>24</sup> **"Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection"**, W.C.W. Chan, S. Nie, *Science* 281 (1998) 2016.
- <sup>25</sup> **"Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging"**, W.C.W. Chan, D.J. Maxwell, X.H. Gao, R.E. Bailey, M.Y. Han, S. Nie, *Curr. Opin. Biotech.* 13 (2002) 40.
- <sup>26</sup> **"Overview of Stabilizing Ligands for Biocompatible Quantum Dot Nanocrystals"**. Y. Zhang and A. Clapp. *Sensors*, 11 (2011) 11036.
- <sup>27</sup> **"Highly luminescent flexible quantum dot-clay films"**, Tetsuka, H.; Ebina, T.; Mizukami, F. *Adv. Mater.*, 20 (2008) 3039.
- <sup>28</sup> **"Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels"**. Resch-Genger, U.; Grabolle, M.; Cavaliere-Jaricot, S.; Nitschke, R.; Nann, T. *Nat. Methods*, 5 (2008) 763.
- <sup>29</sup> **"Compact cysteine-coated CdSe(ZnCdS) quantum dots for in vivo applications"**. Liu, W.; Choi, H.S.; Zimmer, J.P.; Tanaka, E.; Frangioni, J.V.; Bawendi, M. *J. Am. Chem. Soc.* 129 (2007) 14530.
- <sup>30</sup> **"Sugar-quantum dot conjugates for a selective and sensitive detection of lectins"**. Babu, P.; Sinha, S.; Suroliya, A. *Bioconjugate Chem.*, 18 (2007) 146.
- <sup>31</sup> **"Self-assembly of CdSe-ZnS quantum dot bioconjugates using an engineered recombinant protein"** Mattoussi, H.; Mauro, J.M.; Goldman, E.R.; Anderson, G.P.; Sundar, V.C.; Mikulec, F.V.; Bawendi, M.G. *J. Am. Chem. Soc.*, 122 (2000) 12142.
- <sup>32</sup> **"Multifunctional ligands based on dihydrolipoic acid and polyethylene glycol to promote biocompatibility of quantum dots"**. Susumu, K.; Mei, B.C.; Mattoussi, H. *Nat. Protoc.* 4 (2009) 424.
- <sup>33</sup> **"Enhancing the stability and biological functionalities of quantum dots via compact multifunctional ligands"**. Susumu, K.; Uyeda, H.T.; Medintz, I.L.; Pons, T.; Delehanty, J.B.; Mattoussi, H. *J. Am. Chem. Soc.* 129 (2007) 13987.
- <sup>34</sup> **"Oligomeric ligands for luminescent and stable nanocrystal quantum dots"**. Kim, S.; Bawendi, M.G. *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 14652.
- <sup>35</sup> **"Surface modification of CdSe and CdSe/ZnS semiconductor nanocrystals with poly(N,N-dimethylaminoethyl methacrylate)"**. Wang, M.; Oh, J.K.; Dykstra, T.E.; Lou, X.; Scholes, G.D.; Winnik, M.A. *Macromolecules*, 39 (2006) 3664.
- <sup>36</sup> **"Microminiaturized immunoassays using quantum dots as fluorescent label by laser confocal scanning fluorescence detection"**. B. Sun, W. Xie, G. Yi, D. Chen, Y. Zhou and J. Cheng *J. Immunol. Methods*, 249 (2001) 85.
- <sup>37</sup> **"Conjugation of luminescent quantum dots with antibodies using an engineered adaptor protein to provide new reagents for fluoroimmunoassays"** E.R. Goldman, G.P. Anderson, P.T. Tran, H. Mattoussi, P.T. Charles, J.M. Mauro, *Anal. Chem.* 74 (2002) 841.

- <sup>38</sup> **“Luminescent Quantum Dot-Bioconjugates in Immunoassays, FRET, Biosensing, and Imaging Applications”** H. Mattoussi, I.L. Medintz, A.R. Clapp, E.R. Goldman, J.K. Jaiswal, S.M. Simon, J.M. Mauro, *JALA*, 9 (2004) 28.
- <sup>39</sup> **“Nanoparticles in bioanalytics”**. D.M. Willard, *Anal. Bioanal. Chem.* 376 (2003) 284.
- <sup>40</sup> **“Development of a quantum dot-based fluorescent immunoassay for progesterone determination in bovine milk”**, Trapiella-Alonso L., Costa-Fernández J.M., Pereiro R. and Sanz-Medel A. *Biosensors and Bioelectronics*, 26 (2011) 4753.
- <sup>41</sup> **“Multiplexed Toxin Analysis Using Four Colors of Quantum Dot Fluororeagents”**. E.R. Goldman, A.R. Clapp, G.P. Anderson, H.T. Uyeda, J.M. Mauro, I.L. Medintz, H. Mattoussi, , *Anal. Chem.* 76 (2004) 684.
- <sup>42</sup> Sociedad española de oncología médica  
<http://seom.org/seomcms/images/stories/recursos/masmir/pdf/growingUP6/DefinicionesGup.pdf>
- <sup>43</sup> **“Nanoparticle-based bio-bar codes for the ultrasensitive detection of proteins”**. Jwa-min Nam, C shad Thaxton, Chad A. Mirkin *Science* 301 (2003) 1884.
- <sup>44</sup> **“Immunogold-silver staining a new method of immunostaining with enhanced sensitivity”** Holgate, C., Jackson, P, Cowen, P., and Bird, C. *J Histochem Cytochem* 31 (1983) 938.
- <sup>45</sup> **“Light microscopic visualization of colloidal gold on resin-embedded tissue”**. Danscher G, Nørgaard *JOR. J Histochem Cytochem* 31 (1983) 1394.
- <sup>46</sup> **“Au nanoparticle- and silver-enhancement reaction-amplified microgravimetric biosensor”**. X. Su, S. Fong Yau Lib and S. J. O’Shea, *Chem. Commun.* 8 (2001) 755.
- <sup>47</sup> **“Silver-Enhanced Colloidal Gold Electrochemical Stripping Detection of DNA Hybridization”** J. Wang; R. Polsky; D. Xu, *Langmuir* 17 (2001) 5739.
- <sup>48</sup> **“An electrochemical stripping metalloimmunoassay based on silver-enhanced gold nanoparticle label”**. X. Chua, X. Fua, K. Chena, G. Shenb, R.Yub. *Biosensors and Bioelectronics* 20 (2005) 1805.
- <sup>49</sup> **“Highly sensitive immunoassay based on immunogold-silver amplification and inductively coupled plasma mass spectrometric detection”**. Liu R., Liu X., Tang Y.R., Wu L., Hou X.D., Lv Y. *Anal. Chem.* 83 (2011) 2330.
- <sup>50</sup> **“Elemental mass spectrometry for quantitative proteomics”**. Sanz-Medel A, Montes-Bayón M, del Rosario Fernández de la Campa M, Encinar JR, Bettmer J. *Anal Bioanal Chem.* 390 (2008) 3
- <sup>51</sup> **“Elemental mass spectrometry: a powerful tool for an accurate characterisation at elemental level of quantum dots”** Montoro Bustos, A. R.; Ruiz Encinar, J.; Fernández-Argüelles, M. T.; Costa-Fernández, J. M.; Pereiro, R.; Sanz-Medel, A. *Chem. Commun.*(2009) 3107.
- <sup>52</sup> **“Elemental and molecular detection for Quantum Dots-based immunoassays: A critical appraisal”**. Montoro Bustos, A. R.; Trapiella-Alfonso, L.; Ruiz Encinar, J.; Costa-Fernández, J.; Pereiro, R.; Sanz-Medel, A. *Biosens. Bioelectron.* 33 (2012) 165.
- <sup>53</sup> **“Photocatalytic activity of quantum dots incorporated in molecular sieves for generation of hydrogen”**. A. Pourahmad *Spectrochimica Acta* 94 (2012) 18.
- <sup>54</sup> **“Prostate antigen: a new potential marker for prostatic cancer”** Wang, M. C., Papsidero, L. C., Kuriyama, M., Valenzuela, L. A., Murphy, G. P., and Chu, T. M. *Prostate*, 2 (1981) 89.
- <sup>55</sup> **“Measurement of prostate-specific antigen in serum as a screening test for prostate cancer”** Catalona WJ, Smith DS, Ratliff TL, Dodds KM, Coplen DE, Yuan JJ, Petros JA, Andriole GL. *N Engl J Med*, 325 (1991) 1324.
- <sup>56</sup> **“Prostate specific antigen recurrence after definitive therapy”** Freedland SJ, Moul JW. *J. Urol.* 177 (2007) 1985.

- <sup>57</sup> **"Serum total and free prostate-specific antigen for breast cancer diagnosis in women"**. Black MH, Giai M, Ponzone R, Sismondi P, Yu H, Diamandis EP. *Cancer Res.* 6 (2000) 467.
- <sup>58</sup> **"Improving the Accuracy of Mammography: Volume and Outcome Relationships"**. Esserman, L.; Cowley, H.; Eberle, C.; Kirkpatrick, A.; Chang, S.; Berbaum, K.; Gale, A. J. *Natl. Cancer Inst.* 94 (2002) 369.
- <sup>59</sup> **"Comparison of CEA, MCA, CA 15-3 and CA 27-29 in follow-up and monitoring therapeutic response in breast cancer patients"** Lauro S, Trasatti L, Bordin F, et al. *Anticancer Res*, 19 (1999) 3511.
- <sup>60</sup> **"Mn-doped ZnS quantum dots for the determination of acetone by phosphorescence attenuation"**. Sotelo-Gonzalez E, Fernandez-Argüelles MT, Costa-Fernandez JM, Sanz-Medel A. *Anal Chim Acta.* 712 (2012) 120
- <sup>61</sup> **"Exploring Mn-doped ZnS quantum dots for the room-temperature phosphorescence detection of enoxacin in biological fluids"**, Y.He, H-F Wang, X-P Yan, *Anal. Chem* 80 (2008) 3832.
- <sup>62</sup> **"Synthesis of water-soluble ZnS:Mn<sup>2+</sup> nanocrystals by using mercaptopropionic acid as stabilizer"**, J.Q. Zuang, X.D. Zhang, G. Wang, D.M. Li, W.S. Yang, T.J. Li, *J. Mater Chem.* 13 (2003) 1853.
- <sup>63</sup> **"Capping of CdSe–ZnS quantum dots with DHLA and subsequent conjugation with proteins"**. Clapp A.R., Goldman E.R., Mattoussi H. *Nat. Protoc.* 1 (2006) 1258.
- <sup>64</sup> **"Yellow-orange light emission from Mn<sup>2+</sup>-doped ZnS nanoparticles"**, R. Sarkar, C.S. Tiwary, P. Kumbhakar, S. Basu, A.K. Mitra, *Physica E* 40 (2008) 3115.
- <sup>65</sup> **"Separation and characterization of nanoparticles in complex food and environmental samples by field-flow fractionation"** F. Kammer, S. Legros, E. H. Larsen, K. Loeschner, T. Hofmann,. *Trends in Analytical Chemistry*, 30 (2011) 425.
- <sup>66</sup> **"Synthesis and characterization of polymer-coated quantum dots with integrated accepto dyes as FRET-based nanoprobe"**, 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, *NanoLetters* 7 (2007) 2613.
- <sup>67</sup> **"Facile chemical deoxygenation of micellar solutions for room temperature phosphorescence"**, M.E. Díaz-García, A. Sanz-Medel, *Anal.Chem.* 58 (1986) 1436.